



Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

**Alteraciones en la hematopoyesis
y el metabolismo de la L-arginina durante
la infección aguda experimental por
*Trypanosoma cruzi***

Tesis Doctoral

Sofía Carbajosa González

Madrid, 2014



Tesis doctoral

**Alteraciones en la hematopoyesis
y el metabolismo de la L-arginina durante
la infección aguda experimental por
*Trypanosoma cruzi***

Esta memoria ha sido presentada por la
Licenciada en Bioquímica y Licenciada en
Biología **Sofía Carbajosa González**, para optar al
grado de Doctor en Biología Molecular


Directores de la tesis

Dr. Manuel Fresno Escudero,

Catedrático del Departamento de Microbiología
de la U.A.M.

Dra. Núria Gironès Pujol

Profesor Contratado Doctor del Dpto. de
Biología Molecular de la U.A.M.



**A mis padres,
porque siempre están ahí**

AGRADECIMIENTOS

Primero quería dar las gracias a todo el lab 226 en su conjunto, como esencia! Qué gran gustazo ha sido poder formar parte de vosotros. No os imagináis lo feliz que me habéis hecho. No se si esto de la ciencia será lo mío pero no cambio estos años, este día a día con vosotros, ni por todo el oro del mundo. Fijaos cuanto os querré que hasta estoy dispuesta a criar unos hijos con vosotros en comunidad... jajajaja, que gran sueño ese de ``Los Hijos del 226``!

En serio os digo que dudo mucho que vuelva a tener un día a día laboral tan maravilloso como el que he conseguido con vosotros. GRACIAS.

Ahora en particular:

Quería agradecerte a ti, **Manolo**, que me dieras la oportunidad de hacer la tesis en tu laboratorio. Quiero resaltar, que aunque estás a mil cosas (es lo que tiene ser todo un jefeazo) eres capaz de captarlo todo al vuelo y de dar en el clavo cuando más se necesita. También te quiero agradecer el entusiasmo que le pones. Siempre ha sido un placer dar seminarios de grupo y hacer reuniones contigo porque enchufas energía y motivación y consigues que me reilusione y que quiera trabajar mucho. Eso es ser un buen jefe. GRACIAS.

Gracias a ti, **Nuri**, por ser tan humana. Por tu comprensión. Por tu risa. Por ser cercana. Se que puedo contarte cualquier cosa, científica ó personal, y que vas a escucharme e intentar ayudarme. Gracias también por el buen ambiente que hay en la U de cruzi, en parte gracias a ti, que nos dejas paversear a nuestras anchas!

Y mis compañeros queridooooos!!!

Néstor, que te voy a decir mi genial compañero. Tantas charlas, tantas risas, tantos delirios... Hubo un antes y un después para mi en este laboratorio desde alguna que otra conversación contigo. Como te echo de menos... Cómo vamos a hacer??? Los de segunda división tenemos que apoyarnos mutuamente. Quiero tenerte ceercaaaa!!!

Carlos!! Cómo te haces querer jodio! Y qué buen público eres. Me haces sentir que molo y todo. Qué guay ha sido compartir contigo todo este tiempo. Mil gracias por ser tan encanto y por ayudarme, que sin ti aún seguiría contando células!!

Maiki!!!! Ha sido un gustazo trabajar y festejar a tu lado. Y hablar de nuestras cositas de chicas y escuchar tus sabios consejos. GRACIAS

Jujur!! Tu nombre me evoca fiesta y despiporre, a la par que elegancia y saber estar. Qué más se puede decir de ese ser maravilloso, capaz de conservar su glamour natural a pesar de tirarse una mañana entera paseándose con un calzoncillo enganchado al cinturón! Qué buenos momentos! La Sonia se siente muy agradecida.

Y el ``pequeño`` **Javi**, ese prometedor científico!! Me da rabia no haber podido estar más cerca tuyo y ayudarte más. Creo que haríamos un buen equipo.

AGRADECIMIENTOS

Y gracias a esa **Alba** guapísima! Eres un encanto. Siempre me animas y me haces sentir valorada.
Y a esa **Marta** organizadora, siempre en todo y pendiente de todo el mundo. Con todo su buen humor!

A **Kostas**, tan brillante y dispuesto a ayudar en todo. "¿Que tienes una duda? pregúntale a Kostas" Ha sido genial haber podido contar contigo. Qué sería del 226 sin ti!

Y mi querida **Inés**!! Eres tan buena y tan loca...q combinación perfecta, q personaje! Cada vez que me acuerdo de nuestras aventuras esquiadoras...vaya dos!

Y esa **Vini**!! Toda una artista!! Qué derroche de simpatía!

A **Carmencita**, eres mi ejemplo a seguir de una vida bien agarrada, de una feminidad consciente. Qué charlas sobre maternidad en el comedor... Se que cuando sea madre me acordaré muchísimo de ti y todas esas charlas cobrarán todo su sentido. GRACIAS.

Y **Natalia**, otro gran ejemplo! Viva imagen de científica y profesora brillante, segura y bien mujer!

Albertooo. Cómo me ha gustado formar parte de ese elenco de mujeres que siempre te rodea para charlar de sentimientos, crisis, sueños... Qué tío! Y bien macho al mismo tiempo, no se vayan a creer! Q guay bailar contigooooo!!

Y esa **Bea**! Pura fiesta, energía y buen humor! Siempre hay alguien dispuesto a dar más!! Incansable Bea. Qué gustazo haber compartido contigo tanta fiesta!

Y mi **Carmen Punzón**, la de broncas que me habré llevado!!! Sin embargo, con esa alegría y vitalidad que desprendes las broncas se llevan bien, jeje.

Y, por supuesto a **María Chorro**, otra que tal baila! Con todo lo que me has regañado si tú no has conseguido que me vuelva más cuidadosa es que no hay nada que hacer conmigo! Qué personajazo estás hecha. Qué fuerza y personalidad desprendes. Y esas tapas que nos consigeeeeesss!!!

Ana! Cómo me gusta tenerte cerca, madre! siempre riéndote de las pavadas que digo, que maravillaaaa!!!

Y a esa mami **Ruth**, qué serenidad desprendes. Me gusta escucharte contar tus historias y ver que se puede compatibilizar bien el trabajo y la familia.

Y **Lucía** simpatiquísimaaa! Qué buen ambiente que creas! q gusto ha sido tenerte con nosotros!

También a **Cristina**, qué divertida que eres. Por qué no viniste antes!! Me hubiera gustado compartir estos años contigo, creo que habría estado muuuy guay!

Y esas chicas nuevas, **Marta** e **Inés**! No he podido conocerlos casi pero os deseo lo mejor en este mundo de locos en el que os estáis introduciendo.

Y a las chicas del 126!! Raquel, Elena, Gemma, Ana, Paloma. Qué divertidooooo.... esas jornadas, esas cenas... Siempre ha sido un gustazo cruzarme con vosotras y cotorrear un poco!

Y a **Iñiguez** que aunque no te acordarás, fue un comentario tuyo en un informal la semillita de una idea que al final ha resultado ser parte importante de mi tesis.

Gracias a ti también **Henar**, por esa tesis que fue mi libro de cabecera en mis primeros meses en el labo. Espero haber estado a tu altura en la continuación de tu legado.

Y por supuesto a **Mada**!! Se que te he hecho renegar en muchas ocasiones y lo siento mucho, pero madre mía, qué habría hecho yo sin ti!! Qué haría el mundo sin ti, en general! Sería un caos! Menos mal que estás para ayudarnos a organizarnos un poco. Mil gracias por tu ayuda!

Gracias a todo el maravillosos **personal de los servicios del CBM**, vuestra ayuda resulta imprescindible para llevar a cabo el trabajo, en especial al Silvia y a Berta (de citometría), a Alfonso (de cuando estaba en cultivos P2 virus), a las chicas de microscopía, al personal del animalario y a esas chicas simpatiquísimas del servicio de limpieza en especial a Rosa que tanto nos alegra la vida con su buen humor!!

También gracias a todos los compañeros del CBM de todos los labos que me han ayudado alguna vez, que son muuuchos!!

Y ahora a mi gente de Córdoba (Argentina)!

Lo primero gracias a ti, **Susana**, por aceptarme en tu laboratorio. Gracias por tu amabilidad, tu buen humor y tu buena disposición. Y por tu ayuda en los experimentos! Me hiciste sentir muy muy cómoda. GRACIAS.

Gracias a ti también **Pilar**. Fue un gustazo poder hablar de ciencia contigo. Admiro mucho tu trabajo. De hecho los primeros papers que me leí de *T. cruzi* eran tuyos!!

Y gracias a **Colo** (Alfredo) y a **Luisi** que tan bien me cuidasteis y me ayudasteis cuando llegué al laboratorio. Sois un encanto!! Qué pareja de 10! GRACIAS

Y a mi querido **Flacooo** (Augusto), no se que tienes pero contigo me siento como en casa. Eres como familia. No sabes lo maravilloso que es eso cuando estas lejos de casa. GRACIAS

También gracias a **Nico** por tu ayuda y por tus chistes que me encantan! y a la joven y prometedora **Lili**! Y a **Roxana** y a **Eugenia** por vuestra ayuda en los seminarios!

Gracias también a **Pilar Crespo** y a **Paula Abadie** por vuestra ayuda en citometría y en los *sortings*! Como me hizo sufrir ese citometroooooo!!

Y por supuesto al resto de mis compañeros del 103!! Me hicisteis sentir muy integrada! Estuve feliz con vosotros!! En especial gracias a ti **Jime** eres un amor, también estar cerca tuyo me hace sentir como en casa. Gracias por preocuparte por mi.

También gracias a **Cintia** y a **Laura** por vuestra simpatía!

AGRADECIMIENTOS

Pero sobretodo quería agradecerte a ti, mi querido **Colo** (David), mi compañero de fatigas emocionales y testigo en primera línea de todos los cambios locos que Córdoba ha traído a mi vida. Qué grande ha sido conocerte. Espero saber cuidarte y tenerte cerca siempre.

A mis **amigos queridos de la Facul!!** Con vosotros di mis primeros pasos en el mundo de la ciencia. Fueron todas esas conversaciones científico-freakies que tuvimos las que hicieron brotar en mí un espíritu científico. Gracias **Martis, Mapache** (que habría hecho sin tu ayuda!!), **Walter** (contigo agarré mi primera pipetaaa), **Jorge, Celia, Luci, Carla, Marcos, Jaime Jurado Jaime Ramos...** Os quiero. Por muchos jueves más!! GRACIAS

Y a **Lorena!**, mi querida amiga de bioquímica, del CBM y mucho más... Qué maravilla es saber que, pase el tiempo que pase, nos veamos más o menos, puedo contar contigo. Que nos ponemos al día en un momentito y es como si nos hubiéramos visto el día anterior. GRACIAS

Y a mis queridos **amigos del barrio**, qué os voy a decir, con muchos de vosotros he crecido! Soy como soy, en parte gracias vosotros. Mis queridos **Estefanía, Bea, Zana, Lurdes, Cris, Jose, Maxi, Almu Rey, Almu Búrdalo, Pedro, Grande, Rebeca, Rafa, David, Javi, Rubén....** Os quiero. Por muchos años más! GRACIAS

Y a mi **María** y mi **Miguell!** Compañeros de teatro y muuuchoo más! Gracias por ser tan maravillosos!

Y gracias a ti, **Juan**, mi compañero de vida tanto tiempo. A tu lado y gracias a ti me he construido a mi misma. Ojala pudiera devolverte algún día todo lo bueno que me has dado. GRACIAS.

Y a mi querida **familia!!** La **grandota!** Me encanta porque cuando os miro me veo reflejada a mi misma y al revés, os veo a vosotros reflejados en mí. Me siento orgullosa de estar hecha de vuestra misma pasta. Me encantáis, o mejor dicho (aunque en realidad esté mal dicho) ME ENCANTAMOS!! Gracias a mis queridos: abuela **Soco**, abuela **Alicia**, abuelo **Eduardo**, abuelo **Lorenzo, Pili, Juan Carlos, Marcos, Laura, María, Tere, Jose, Beatriz, María Jesús, Jose Luis, Pablo, May, Sergio, Juan, María José, Estela, Jara, Marta, Julián, Álvaro, Oscar, Sonia, Irene y Clara.**

Gracias a ti, **Diego**, que entraste en mi vida de golpe con toda tu fuerza, para revolverlo todo hasta lo más profundo de mí, y me enchufaste una alegría y unas ganas de vivir que tenía un poco olvidadas. Maldito trasmisooooor!! No veo la hora de estar a tu lado.

Y gracias a mi querido **hermano Raúl!!** Qué maravilla que existas!! Yo que me tiré la infancia soñando con tener hermanos y por fin llegaste!! Como te quiero!! Deseo con todas mis fuerzas que te vaya bien en la vida y seas muy muy feliz. Y se que lo vas a conseguir porque eres un

chico maravilloso que se va a convertir en un hombre más maravilloso todavía. Sólo pido poder estar cerca tuyo para poder verlo!! Te quiero.

Y por último gracias a **mis padres, Emilia y Jose María**, por todo vuestro amor incondicional que es mi soporte. Porque se que pase lo que pase y haga lo que haga siempre me apoyareis y estaréis a mi lado y eso me hace libre. GRACIAS

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	23
RESUMEN.....	27
SUMMARY.....	31
INTRODUCCIÓN.....	35
ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	35
Vías de transmisión y ciclo de vida del parásito.....	36
Clínica de la enfermedad.....	37
Respuesta inmune innata a <i>T. cruzi</i>	38
Respuesta inmune adaptativa a <i>T. cruzi</i>	40
Alteraciones hematológicas y del sistema inmune durante la infección aguda por <i>T. cruzi</i>	41
HEMATOPOYESIS.....	42
Hematopoyesis e infección.....	44
Hematopoyesis extramedular.....	45
TIMOPOYESIS.....	46
Selección positiva.....	47
Selección negativa.....	47
Involución tímica.....	48
MDSCs Y METABOLISMO DE LA L-ARG.....	49
Metabolismo de la L-arg en células mieloides.....	50
Inmunosupresión debida a la actividad Arg I.....	51
Inmunosupresión debida a la actividad INOS.....	53
Inmunosupresión debida a Arg I e iNOS en cooperación.....	53
OBJETIVOS.....	57
MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
Modelos murinos de infección.....	61
Obtención de células de timo, bazo y médula ósea.....	61
Citometría de flujo.....	62
Análisis de expresión de proteínas por <i>western blot</i>	62
Análisis de mRNAs por RT-PCR cuantitativa.....	63
qPCR para la detección del parásito.....	63
Microscopía de fluorescencia.....	63
Ensayos de TUNEL.....	64
Purificación del infiltrado celular del corazón.....	65

Aislamiento de células CD11b ^{pos} Ly6G ^{neg} y células Ly6G ^{pos} del infiltrado inflamatorio del corazón.....	65
Sorting de células CD11b ^{pos} Ly6G ^{neg} Ly6C ^{high} , células CD11b ^{pos} Ly6G ^{pos} Ly6C ^{low} y células CD11b ^{neg} Ly6C ^{pos} de médula ósea y bazo.....	65
Ensayos de supresión de la proliferación de células T.....	66
Estudios metabólicos.....	66
Cultivo de tripomastigotes in vitro e Infección de células Raw 264.7.....	67
Análisis estadístico.....	68
Tabla 1. Tampones y Medios.....	69
Tabla 2. Anticuerpos.....	70
Tabla 3. Sondas Taqman.....	71
RESULTADOS.....	75
ALTERACIONES EN LA HEMATOPOYESIS DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA POR <i>T. CRUZI</i> :	
MÉDULA ÓSEA Y BAZO.....	75
HSCs y progenitores oligopotentes.....	76
Eritropoyesis.....	78
Linfopoyesis B.....	79
Mielopoyesis.....	81
Resumen de las poblaciones analizadas.....	84
ALTERACIONES EN LA HEMATOPOYESIS DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA POR <i>T. cruzi</i> :	
TIMO.....	85
Células CD4 CD8 DP en órganos periféricos.....	86
Apoptosis en timo.....	87
Precusores de células T previos a los timocitos DP.....	88
Efecto de la citoquina IL6 en las alteraciones tímicas durante la infección por <i>T. cruzi</i>	90
CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA POR <i>T. cruzi</i>	94
MDSCs en corazón.....	94
MDSCs en médula ósea.....	95
MDSCs en bazo.....	98
MDSCs en ganglio.....	100
MDSCs en timo.....	101

METABOLISMO DE LA L-ARGININA DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA POR <i>T. cruzi</i>	104
Efecto del suplemento de L-arg durante la fase aguda de la infección por <i>T. cruzi</i>	108
Efecto del suplemento de L-arg en la expresión de la cadena ζ del CD3.....	110
Efecto del suplemento de L-arg en la activación de las rutas de mTOR y GCN2.....	111
Efecto del suplemento de L-arg en la producción de NO.....	113
Efecto tripanocida de la L-arg.....	114
Efecto del suplemento de L-arg cuando la iNOS está inhibida.....	115
Efecto del suplemento de L-arg y la inhibición de la iNOS en la hematopoyesis durante la infección por <i>T. cruzi</i>	116
DISCUSIÓN.....	121
ALTERACIONES EN LA HEMATOPOYESIS DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA POR <i>T. cruzi</i> : MÉDULA ÓSEA Y BAZO.....	121
ALTERACIONES EN LA HEMATOPOYESIS DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA POR <i>T. cruzi</i> : TIMO.....	125
PAPEL DEL METABOLISMO DE LA L-ARG DURANTE INFECCIÓN AGUDA POR <i>T. cruzi</i>	129
CONCLUSIONES.....	135
CONCLUSIONS.....	139
REFERENCIAS.....	143
ANEXO.....	154

LISTA DE ABREVIATURAS

ACD	"Anemia of Chronic Disease"	MEP	"Megakaryocyte/erythrocyte progenitors"
ADS	"Arginine Deficiency Syndrome"	MHC	"Major Histocompatibility Complex"
Af.	Alexa fluor	MPP	"Multipotent progenitors"
APC	"Antigen Presenting Cells"	mTOR	"Mammalian target of rapamycin"
ATF4	"Activating transcription factor 4"	NADPH	"Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate"
ATCC	"American Type Culture Collection"	NI	No infectado
Arg	Arginasa	NK	"Natural Killer"
BD	BD Pharmingen	NO	"Nitric oxide"
BSA	Albúmina sérica bovina	NOS	"Nitric Oxide Synthasa"
BV.	"Brilliant Violet"	NOHA	Nw-hidroxi-L-arginina
CAT	"Cationic Aminoacid Transporter"	O.C.T.	"Optimum cutting temperature"
Cdk4	"cyclin-dependent kinase 4"	ODC	Ornitina Decarboxilasa
CFU	"Colony Forming Units"	OMS	Organización Mundial de la Salud
CF	Citometría de flujo	PAMP	"Pathogen Associated Molecular Pattern"
CLP	"Common Lymphoid Progenitors"	PCR	"Polymerase chain reaction"
CMP	"Common Myeloid Progenitors"	PBS	Tampón fosfato salino
DN	CD4 ^{neg} CD8 ^{neg}	PE	Ficoeritrina
DNA	"Deoxyribonucleic acid"	PGE2	Prostaglandina E2
DP	CD4 ^{pos} CD8 ^{pos}	poli (I:C)	"Polyinosinic:polycytidylic acid"
d.p.i.	Días post- infección	qPCR	"Quantitative polymerase chain reaction"
FITC	Isotiocianato de fluoresceína	Rag	Recombinasa
FLT3	"Fms-Like Tyrosine Kinase"	RNA	"Ribonucleic acid"
eIF2α	"Eukariotic Initiation Factor 2"	RNOS	"Reactive nitrogen oxyde species"
Fc	Región constante de las Ig	ROS	"Reactive oxygen species"
GCN2	"General control non-depressible 2"	RQ	"Relative quantity"
GM-CSF	"Granulocyte/macrophage CSF"	RT-PCR	"Reverse transcription PCR"
GMP	"Granulocyte/macrophage progenitors"	SCF	"Stem cell factor"
HBSS	"Hank's Balanced salt solution"	SFB	Suero fetal bovino
HSC	"Haematopoietic stem cells"	SIDI	Servicio Interdepartamental de Investigación
IFN	Interferon	SM	Separación magnética
IHF	Inmunohistofluorescencia	SP	CD4 ^{pos} CD8 ^{neg} ó CD4 ^{neg} CD8 ^{pos}
IL	Interleuquina	TCR	"T cell receptor"
Ig	Inmunoglobulina	TEC	"Thymic epithelial cells"
INC	"Imputed Normalized Counts"	TGF	"Tumor growth factor"
iNOS	"inducible Nitric Oxide Synthase"	Th	"T helper"
I.P.	Intraperitoneal	TLR	"Toll- like receptors"
KO	"Knockout"	TNF	"Tumor Necrosis factor "
L-arg	L-arginina	Treg	Células T reguladoras
Lin	"Cocktail" de linaje	tRNA	RNA de transferencia
LPS	Lipopolisacárido	TSA	"Tissue Specific Antigen"
LSK	Células Lin ^{neg} Sca1 ^{pos} cKit ^{pos}	TUNEL	"Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling"
M-CSF	"Macrophage colony stimulating factor"	UAM	Universidad Autónoma de Madrid
MDA-5	"Melanoma differentiation associated gene 5"	WB	"Western blot"

RESUMEN

Una infección es un factor de estrés para el sistema hematopoyético donde las células del sistema inmune se consumen en la lucha contra los patógenos y la homeostasis del sistema depende de la repoblación continua de estas células efectoras, desde sus precursores hematopoyéticos. Numerosas enfermedades infecciosas tienen efectos profundos sobre la hematopoyesis, que pueden traer como consecuencia alteraciones hematológicas que compliquen el desarrollo de la enfermedad. La fase aguda de la infección por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas), está asociada a diversas alteraciones hematológicas (como anemia, trombocitopenia y leucopenia) que podrían ser debidas, al menos en parte, a alteraciones en la hematopoyesis. En este trabajo hemos analizado los efectos que tiene la infección aguda por *T. cruzi* en diferentes poblaciones participantes de la hematopoyesis. Hemos determinado que la infección por *T. cruzi* causa una reducción en el número de progenitores oligopotentes del linaje mieloide (CMPs) y linfoide (CLPs) en médula ósea, además de la supresión de la linfopoyesis B, la eritropoyesis y la mielopoyesis en este tejido. La supresión en la mielopoyesis está caracterizada por una reducción en la granulopoyesis pero no en la monopoyesis, pues se detectó un incremento en las células mieloides monocíticas inmaduras hacia el día 13 post- infección. Estas células presentaron características de MDSCs, ya que fueron capaces de suprimir la proliferación de las células T.

Por otro lado, el timo sufre involución aguda durante la infección por *T. cruzi* caracterizada por la casi total desaparición de los timocitos DP. Hemos determinado que esta pérdida no parece deberse a la salida prematura de los timocitos DP a la periferia ni a un incremento en la apoptosis en el timo, sino que parece asociarse a la supresión de la timopoyesis a nivel de los timocitos DN. Observamos un bloqueo en la diferenciación de los timocitos de DN1 a DN2, que parece dependiente de la señalización por IL6 ya que no se observó, en la misma medida, en los ratones deficientes para esta citoquina.

Estos fenómenos de supresión fueron acompañados de un incremento compensatorio de la hematopoyesis extramedular en bazo, dónde se observó mayor eritropoyesis y mayor mielopoyesis, caracterizada esta última por una expansión de células monocíticas inmaduras, también con características de MDSCs, seguida de un incremento en la granulopoyesis.

Las MDSCs ejercen sus efectos supresores mediante mecanismos dependientes del metabolismo del aminoácido L-arg, como la producción de NO por la enzima iNOS o la depleción de la L-arg del medio extracelular debido a una actividad sostenida de la enzima Arg I. En este trabajo detectamos, durante la infección aguda por *T. cruzi*, una disminución en los niveles de L-arg en corazón (principal órgano diana de la infección y dónde describimos la presencia de MDSCs

monocíticas) y en plasma; asociada a un incremento de la actividad arginasa y a una disminución en la actividad NOS.

Existe un gran número de patologías (cáncer, trauma, estrés post-quirúrgico) que se asocian a un déficit de L-arg. Éstas tienen en común la inducción patológica de la enzima Arg I, la represión de la expresión de la cadena ζ del CD3 en las células T y la disminución de la producción de NO. Se han descrito mejoras notables en la resolución de estas patologías mediante el suplemento de L-arg en la dieta. Nosotros proponemos que la fase aguda de la infección por *T. cruzi* podría sumarse a la lista de enfermedades asociadas a déficit de L-arg, ya que en los ratones infectados con *T. cruzi* se reproducen todos los síntomas citados y observamos una importante mejora en la resolución de la fase aguda de la infección con el suplemento de este aminoácido. Los efectos beneficiosos del suplemento de L-arg, durante la infección por *T. cruzi*, parecen deberse a un incremento de la producción de NO que favorecería la eliminación del parásito.

SUMMARY

Infection is a common natural stressor on the haematopoietic system. Immune cells are consumed in the fight against invading pathogens and homeostasis depends on the replacement of these immune effector cells by haematopoietic precursors. Many infectious diseases have profound effects on hematopoiesis, which can trigger blood disorders complicating the disease outcome. The acute phase of infection by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*, the causative agent of Chagas disease), is associated with various blood disorders (such as anemia, leukopenia and thrombocytopenia) which may be due, at least in part, to alterations in hematopoiesis. In this work we have analyzed the effects of acute *T. cruzi* infection in different cellular populations involved in hematopoiesis. We have determined that *T. cruzi* infection causes alterations in hematopoiesis in bone marrow. We observed depletion of common myeloid progenitors (CMPs) and common lymphoid progenitors (CLPs) and suppression of B lymphopoiesis, erythropoiesis and myelopoiesis. The myelopoiesis alterations were characterized by granulocyte depletion but monocyte expansion. The immature monocytic cells presented MDSCs characteristics since they were able to suppress T cell proliferation.

In *T. cruzi* infection the thymus suffers acute involution characterized by the almost complete loss of DP thymocytes. We have determined that this depletion is not associated neither with premature migration of DP thymocytes to peripheral organs, nor with increased apoptosis in thymus during infection. Thymus atrophy during *T. cruzi* infection is associated with suppression of thymopoiesis at the level of DN thymocytes. This suppression was characterized by a blockade between DN1 and DN2 stages, which is likely partially dependent on IL6 signalling, since it was not observed in IL6 KO mice.

These phenomena of suppression were accompanied by a compensatory increase of extramedullary hematopoiesis in spleen, where extramedullary erythropoiesis and myelopoiesis were observed. The latter one characterized by a monocytic cell expansion followed by a granulopoiesis increase. The immature monocytic cells from spleen also presented MDSC characteristics.

The MDSCs exert their suppressive effects by mechanisms dependent on L-arg metabolism, as NO production by iNOS action or L-arg depletion from the extracellular microenvironment due to a sustained Arg I activity. In this work we have observed through metabolomic studies L-arg depletion during *T. cruzi* infection, both in heart (main target of *T. cruzi* infection, where we first described monocytic MDSCs infiltration) and in plasma. This L-arg depletion was due to arginase activity and it was associated to a decrease in NOS activity. A large number of diseases (cancer, trauma, post- surgical stress) are associated with L-arg deficit. They have in common the pathological induction of Arg I enzyme, the repression of CD3 ζ chain expression on T cells and a

SUMMARY

decrease on NO production. Significant improvements in the resolution of these pathologies have been described with L-arg supplementation in diet. We propose that acute *T. cruzi* infection could be considered a new L-arg deficiency associated disease, since all L-arg deficiency associated symptoms described are reproduced in *T. cruzi* infected mice. We also observed a significant improvement in the resolution of the acute infection supplementing L-arg during infection. The beneficial effects of L-arg supplementation, during *T. cruzi* infection seem to be due to a NO production increase that would favour parasite killing.

INTRODUCCIÓN

ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas, también llamada Tripanosomiasis americana, es un desorden multisistémico causado por el parásito protozoo flagelado *T. cruzi* de la familia *Kinetoplastidae* (Rassi et al., 2010). Se sabe que este mal afecta al continente americano desde hace miles de años ya que se han encontrado restos de DNA del parásito en tejidos momificados de los indios Chinchorro del desierto de Atacama datados de 9000 años de antigüedad (Guhl et al., 1999). Sin embargo, la descripción clínica de la enfermedad no apareció en la literatura científica hasta el año 1909, cuando Carlos Chagas realizó la conexión entre la infección aguda del parásito y las manifestaciones clínicas (Chagas, 1909a).

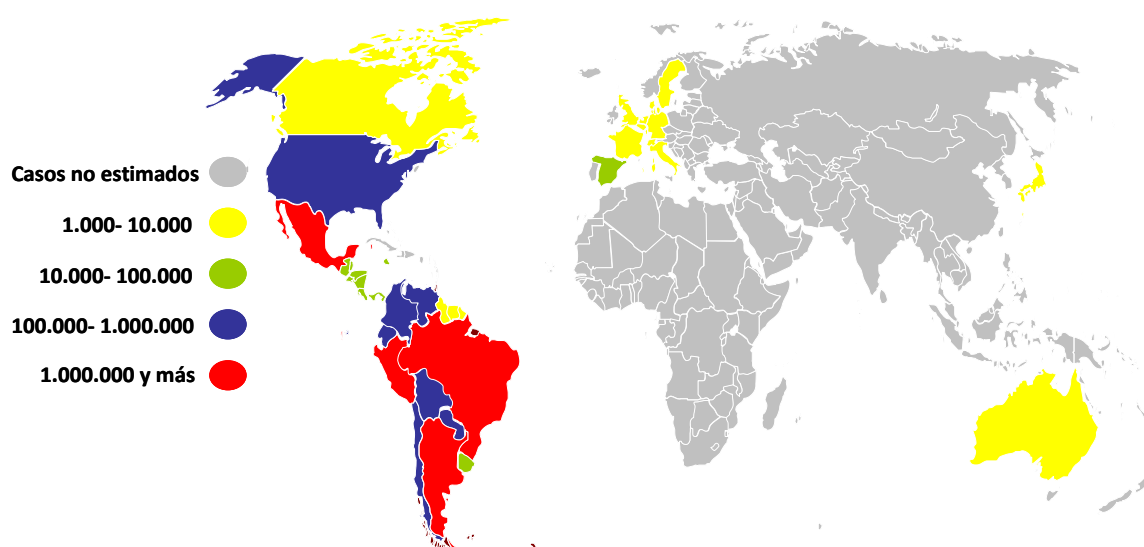


Figura I.1. Mapa de la Incidencia de la enfermedad de chagas en el mundo. Estimaciones del número de individuos infectados por *T. cruzi* en 2009 y su distribución.

<http://olvidados.blogia.com/2009/071801-chagas-100-años-de-olvido.php>

Se estima que aproximadamente 8 millones de individuos están afectados, y alrededor de 100 millones se encuentran en riesgo de contraer la infección, en 21 países de Latinoamérica, desde el norte de México hasta el Sur de Argentina y Chile (Figura I.1). Algunos estudios parecen indicar que la incidencia de la enfermedad ha disminuido en los últimos años (de 700.000 nuevos casos/año en 1990 a 41.200 nuevos casos/año en 2006) (Moncayo and Silveira, 2009), sin embargo, estos datos resultan controvertidos ya que otros estudios sugieren que el número de muertes se ha incrementado en un 10,8% entre los años 1990 y 2010 (Lozano et al., 2012). En cualquier caso, el mal de Chagas se considera un problema de salud pública en Latinoamérica donde causa alrededor de 12.500 muertes al año. La alta tasa de migración a países no endémicos ha extendido los límites de la infección, siendo España, después de Estados Unidos, el segundo país no endémico con mayor cantidad de inmigrantes infectados (entre 47.000- 67.000)

principalmente procedentes de Ecuador, Argentina, Bolivia y Perú (Gascon et al., 2009; Rassi et al., 2010; Schmunis, 2007). Actualmente, la enfermedad de Chagas está reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una de las 17 enfermedades tropicales olvidadas o desatendidas (OMS, 2013).

Vías de transmisión y ciclo de vida del parásito

La transmisión de esta enfermedad a los humanos ocurre vía insecto vector, por transfusión de sangre o transplante de órganos procedentes de individuos infectados, por transmisión vertical de madre a hijo durante el embarazo o por vía oral (Schmunis, 2007).

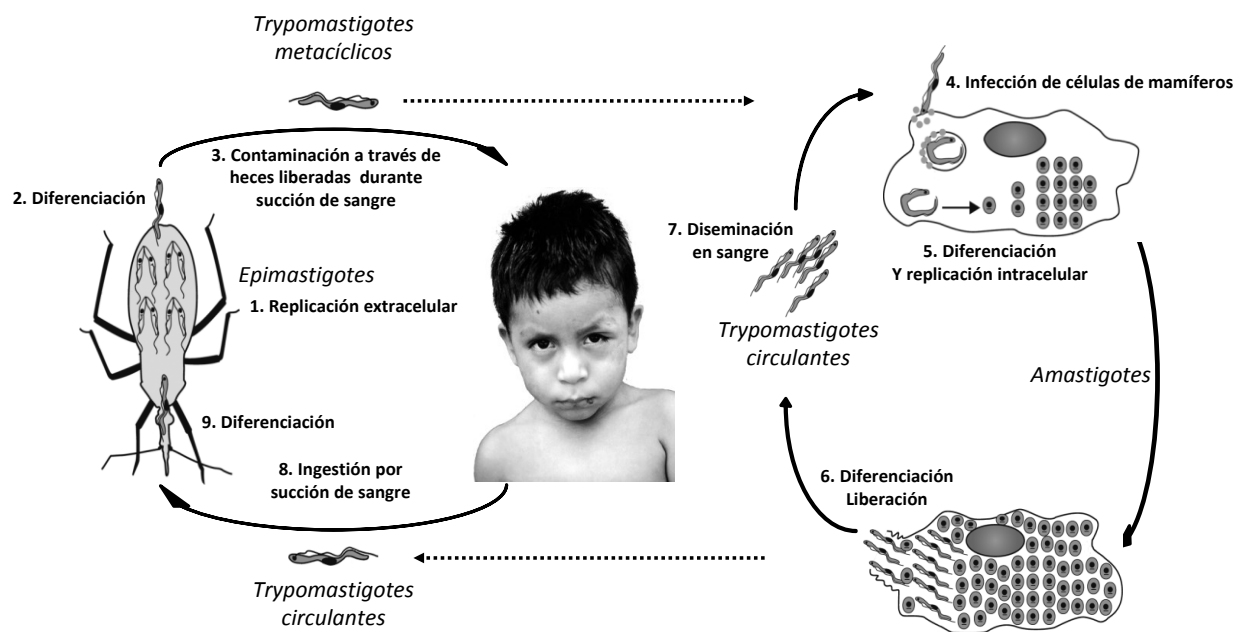


Figura I.2. Esquema del ciclo de vida de *T. cruzi*.

La transmisión vectorial es la principal vía de contagio y forma parte del ciclo de vida del parásito que presenta etapas tanto en hospedadores vertebrados como en invertebrados. Los parásitos se replican de forma extracelular en el intestino proximal de chinches triatominas de la familia *Reduviidae* en forma de epimastigote (la forma replicativa extracelular del parásito) (Figura I.2 nº 1). En la parte distal del intestino de estos insectos los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos (la forma infectiva de células de mamífero) que son alojadas junto con las heces en la ampolla rectal (Figura I.2 nº 2). El insecto perfora la piel del hospedador mamífero para alimentarse de su sangre y al terminar defeca, depositando los tripomastigotes metacíclicos en las cercanías de la herida producida por la picadura (Figura I.2 nº 3). El parásito ingresa en el organismo a través de esta herida, de excoriaciones preexistentes en la piel o por la mucosa ocular u oral, e inmediatamente invade las células del sistema fagocítico mononuclear

del hospedador (Figura I.2 nº 4). Dentro de la célula, el tripomastigote pierde el flagelo y se diferencia en amastigote (la forma replicativa intracelular) (Figura I.2 nº 5). Los amastigotes se replican en el interior de la célula por fisión binaria cada 16- 18 horas y tras varias generaciones se transforman en tripomastigotes sanguíneos circulantes (Figura I.2 nº 6). Estos rompen la membrana plasmática y salen a los espacios intersticiales donde pueden infectar células vecinas o diseminarse por el torrente sanguíneo y linfático e invadir nuevos tejidos (Figura I.2 nº 7). Son especialmente susceptibles a la infección por *T. cruzi* las fibras musculares estriadas (tanto cardíacas como esqueléticas), las fibras musculares lisas, las células nerviosas y las células del sistema fagocítico mononuclear. El ciclo de vida del parásito se completa cuando los tripomastigotes sanguíneos son succionados del torrente sanguíneo por la chinche triatomina mientras se alimenta (Figura I.2 nº 8). Cuando estos alcanzan el estómago del insecto se diferencian de nuevo a epimastigotes (Teixeira et al., 2011) (Figura I.2 nº 9).

Los individuos que residen en las áreas rurales de América Latina son los que se encuentran en un mayor riesgo de infección porque los insectos viven en los techos de paja de las casas de adobe y se alimentan constantemente picando a sus habitantes durante la noche. Dos fármacos (benznidazol y nifurtimox) están disponibles para el tratamiento de la fase aguda de la enfermedad, sin embargo, además de tener un porcentaje muy alto de efectos secundarios, no está claro que sean útiles para la fase crónica. Hasta la fecha, sigue faltando una inmunoterapia efectiva o una vacuna (Rassi et al., 2010).

Clínica de la enfermedad

En la enfermedad de Chagas se pueden distinguir dos fases: la fase aguda y la fase crónica. En la fase aguda, pocos días después de la infección, aparece una lesión inflamatoria local en el sitio de infección donde los tripomastigotes metacíclicos infectan las células de la zona y experimentan las primeras rondas de multiplicación. Cuando los tripomastigotes alcanzan el torrente sanguíneo ocurre la diseminación del parásito por el cuerpo y los tripomastigotes sanguíneos se pueden observar fácilmente al microscopio (parasitemia). Alrededor de un 5% de los individuos infectados desarrollan síntomas de afección cardíaca que refleja una miocarditis severa subyacente que puede conducir a un fallo cardíaco, responsable de las pocas muertes que ocurren en la fase aguda. También puede presentarse meningoencefalitis, especialmente en pacientes inmunosuprimidos. No obstante, normalmente la fase aguda muestra síntomas leves e inespecíficos con lo cual la infección suele pasar desapercibida. Alrededor del 70% de los individuos infectados nunca desarrollarán síntomas. Estos pacientes presentan la forma indeterminada de la enfermedad que se caracteriza por presentar anticuerpos contra el parásito, un electrocardiograma normal y exámenes radiológicos del tórax, esófago y colon normales. El

30% de los pacientes restantes, décadas después de la infección por el parásito, entran en lo que se conoce como la fase crónica, desarrollando las patologías más severas de la enfermedad. Durante esta fase, los parásitos circulantes no se detectan en sangre, pero se produce daño progresivo de los tejidos afectados. La enfermedad puede evolucionar a diferentes patologías: cardíaca (miocarditis dilatada), digestiva (megaesófago y megacolon) o cardiodigestiva. En las afecciones cardíacas frecuentemente se desarrollan cardiomiopatías siendo el fallo congestivo de corazón la causa más común de muerte de éstos pacientes (Machado et al., 2012; Rassi et al., 2012; Rassi et al., 2010).

Distintos estudios han demostrado que *T. cruzi* es genéticamente heterogéneo, con una típica estructura poblacional clonal, llegándose al consenso de la existencia de seis linajes filogenéticos principales con aparente distribución geográfica diferente (Lewis et al., 2009; Zingales et al., 2012). A pesar de que se ha propuesto que la diversidad en las manifestaciones patológicas de la enfermedad se debe al fondo genético del huésped (Andrade et al., 2002; del Puerto et al., 2012) también existen evidencias indirectas de que esta podría ser debida a la variabilidad genética de *T. cruzi* (Zingales et al., 2012). Sin embargo, aún no se ha llevado a cabo una correlación directa, bien caracterizada, entre la diversidad genética de *T. cruzi* y las distintas manifestaciones de la enfermedad.

Se han propuesto dos mecanismos para explicar el origen de las patologías crónicas. El primero se focaliza en la persistencia del parásito y la destrucción de los tejidos infectados de forma sostenida y a lo largo del tiempo, que acabaría desencadenando una inflamación crónica (Kierszenbaum, 2005; Tarleton, 2001; Viotti et al., 1994). El segundo, basándose en la idea de que se encuentran muy pocos parásitos en los tejidos afectados durante la fase crónica, postula una etiología autoinmune de la enfermedad. En esta teoría la infección por *T. cruzi* desencadenaría una respuesta inmune contra los tejidos que podría ser debida o a mimetismos moleculares entre antígenos del parásito y antígenos propios o a la liberación y presentación de antígenos propios derivados del daño celular (Cunha-Neto et al., 2011; Girones et al., 2005). Algunos consideran que la cardiomiopatía chagásica es una enfermedad autoinmune con un fuerte factor genético (Teixeira et al., 2011). Sin embargo, ambos mecanismos: persistencia del parásito y autoinmunidad, no tienen porque ser excluyentes entre sí (Girones et al., 2005; Girones and Fresno, 2003; Levin, 1996; Soares et al., 2001).

Respuesta inmune innata a *T. cruzi*

La infección por *T. cruzi* desencadena una respuesta inmune compleja poco conocida, en la cual, diferentes tipos celulares reconocen a *T. cruzi* y reaccionan de maneras distintas para controlar

la infección. También se conoce poco acerca de la posible diversidad de respuestas inmunes frente los diferentes linajes del parásito.

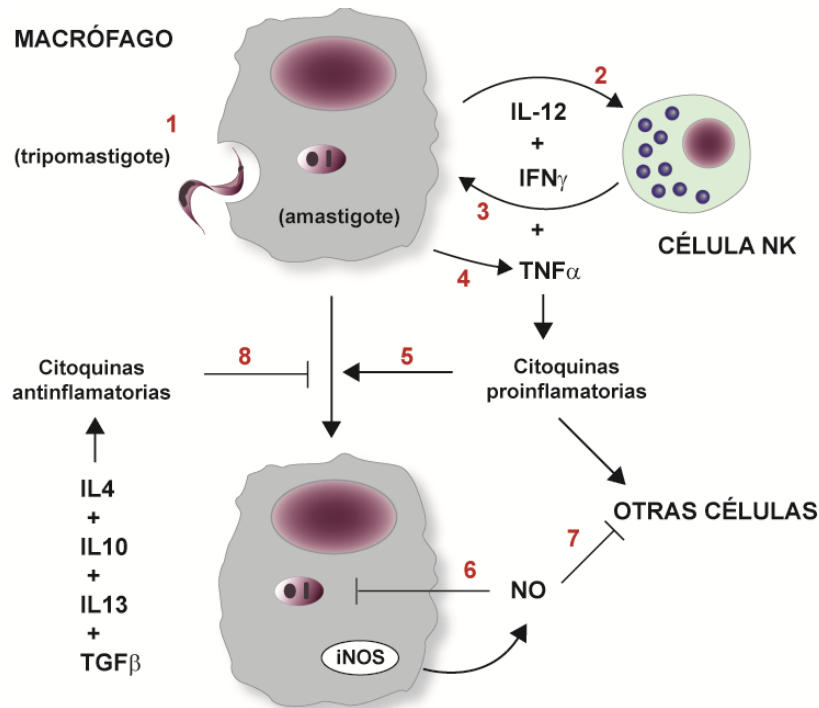


Figura I.3. Esquema de respuesta inmune innata.

T. cruzi es capaz de entrar activamente en una gran variedad de tipos celulares, especialmente macrófagos (Figura I.3, nº 1), desencadenando una diversidad de interacciones moleculares que movilizan la respuesta de la inmunidad innata del hospedador. Los macrófagos infectados secretan IL12 (Aliberti et al., 1996) (Figura I.3, nº 2) que activa a las células NK para producir IFN γ (Cardillo et al., 1996) (Figura I.3, nº 3), que juega un papel crucial en la activación de los macrófagos, ya que induce en ellos la producción de TNF α (Silva et al., 1995) (Figura I.3, nº 4). La IL-12, el TNF α y el IFN γ actúan sinérgicamente sobre los macrófagos donde inducen la expresión de la enzima iNOS (Munoz-Fernandez et al., 1992) (Figura I.3, nº 5).

Los macrófagos producen NO que participa en la destrucción intracelular de los parásitos ya sea mediante modificación química directa de residuos de cisteína de las proteínas o por unión a metaloproteínas importantes en procesos metabólicos (Silva et al., 2003; Venturini et al., 2000; Vespa et al., 1994) (Figura I.3, nº 6). Se ha descrito susceptibilidad a la fase aguda de la infección por *T. cruzi* en ratones deficientes en IFN γ e IL12, (Graefe et al., 2003; Torrico et al., 1991). A su vez también se han descrito fenómenos de inmunosupresión y daño tisular causados por el NO durante la fase aguda de la infección (Abrahamsohn and Coffman, 1995; Gutierrez et al., 2009; Silva et al., 2003) (Figura I.3, nº 7).

Por otro lado la IL10 y el TGF β inhiben la producción de NO, en macrófagos activados por IFN γ , reduciendo su capacidad para destruir parásitos intracelulares (Gazzinelli et al., 1992). También se ha propuesto que la IL4 actúa en cooperación con la IL10, regulando negativamente la producción de IFN γ en bazo (Abrahamsohn et al., 2000) y se ha sugerido que la IL13 también podría estar implicada (Antunez and Cardoni, 2001), (Figura 1.3, nº 8). Sin embargo, la producción de estas citoquinas anti inflamatorias parece importante a la hora de controlar un exceso de respuesta inflamatoria y los efectos deletéreos del NO (Hunter et al., 1997).

Respuesta inmune adaptativa a la infección por *T. cruzi*

Los parásitos que escapan de la vacuola parasitófora o antígenos solubles del parásito, son presentados a las células Th CD4 por las APC a través del MHC-II, a pesar de que la expresión de MHC-II parece estar regulada negativamente durante la infección por *T. cruzi* (Alba Soto et al., 2003). Las células Th son importantes para orquestar la respuesta inmune y cuando se activan se diferencian a los distintos subtipos (Th1, Th2, Th17 y Treg) que expresan diferentes perfiles de citoquinas con distintas funciones. Por otro lado, células no APC presentan péptidos del parásito a través del MHC-I a las células T citotóxicas CD8 que también participan en las respuestas inflamatorias e inmunes que cursan a lo largo de la infección (Garg et al., 1997). Aunque inicialmente se publicó que el sistema perforina/granzima no era necesario para mediar la muerte del parásito (Kumar and Tarleton, 1998), estudios posteriores demostraron que las células T CD8, a través del sistema perforina/granzima y/o por apoptosis mediada por FAS, son importantes para el control de la infección intracelular (Martin and Tarleton, 2004; Muller et al., 2003).

Por su parte, se ha descrito que la activación B no es siempre una respuesta importante en la infección por *T. cruzi*, ya que parece depender de la susceptibilidad del hospedador (Bryan et al., 2010), aunque por otro lado, parece que la generación de anticuerpos es necesaria ya que los ratones deficientes en células B sucumben a la fase aguda de la infección por *T. cruzi* (Kumar and Tarleton, 1998).

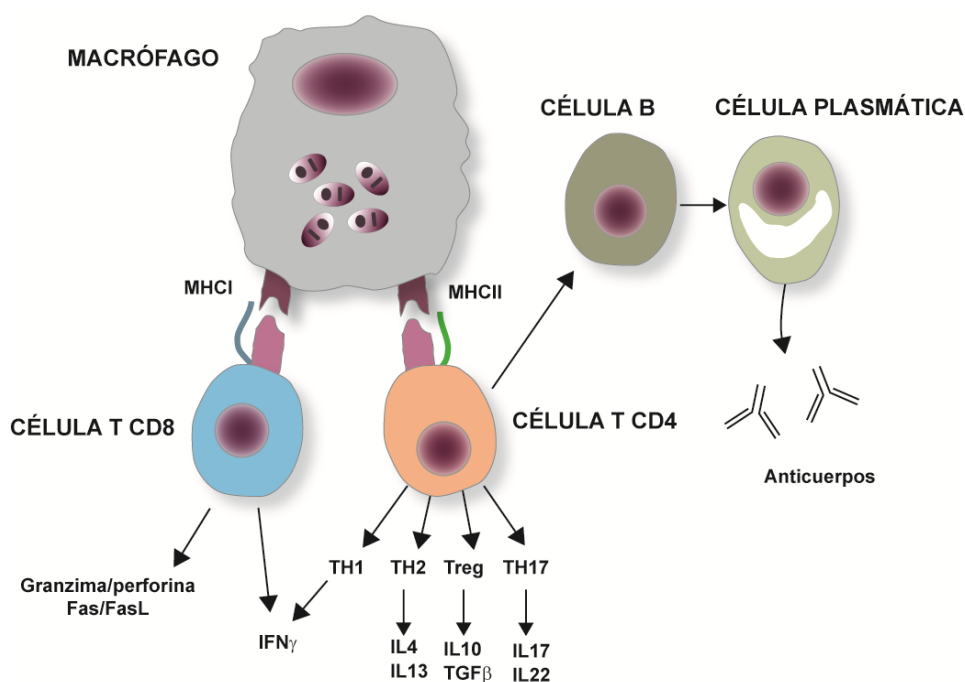


Figura I.4. Esquema de la respuesta inmune adaptativa.

Alteraciones hematológicas y del sistema inmune durante la infección aguda por *T. cruzi*

La fase aguda de la infección por *T. cruzi* está asociada a diversas alteraciones hematológicas como anemia, trombocitopenia y leucopenia, que podrían contribuir a la mortalidad durante la fase aguda de la infección (Cardoso and Brener, 1980). Ya Carlos Chagas describió en sus primeros trabajos que los niños infectados por *T. cruzi* presentaban una profunda anemia (Chagas, 1909b). Estas alteraciones, que también se encuentran en Tripanosomiasis Africana (Ikede et al., 1977), son comunes en infecciones experimentales con tripanosomas. Se ha propuesto que la excesiva producción de mediadores proinflamatorios, como NO o citoquinas como TNF α , podría provocar la destrucción celular causante de estas citopenias (Malvezi et al., 2004; Stijlemans et al., 2010), sin embargo, estas también podrían ser debidas a alteraciones en la hematopoyesis producidas durante la infección (Marcondes et al., 2000).

Por otro lado, durante la infección aguda por *T. cruzi* se observan diversas alteraciones en órganos primarios y secundarios del sistema inmune (aplasia de médula ósea, involución tímica, reducción de las Placas de Peyer y de los ganglios linfáticos mesentéricos, o esplenomegalia) (de Meis et al., 2009), que también podrían estar relacionados con alteraciones en la hematopoyesis y fenómenos de inmunosupresión.

La inmunosupresión durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* se ha relacionado, como se dijo anteriormente, con el estrés oxidativo debido a una excesiva producción de NO por parte de macrófagos activados (Abrahamsohn and Coffman, 1995). Pero también se han propuesto otros mecanismos como represión de la expresión del receptor de la IL2 (Majumder and

Kierszenbaum, 1996) o producción de PGE₂ (Michelin et al., 2005). En nuestro laboratorio observamos inmunosupresión mediada por la producción de NO por parte de MDSCs CD11b^{pos} Gr1^{pos} en bazo (Goni et al., 2002) y por MDSCs monocíticas CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high} con fuerte expresión de Arg I, en corazón (Cuervo et al., 2011). También, recientemente, se ha descrito la presencia de MDSCs productoras de ROS y NO, en bazo y en hígado, durante la infección aguda por *T. cruzi* (Arocena et al., 2013).

HEMATOPOYESIS

El sistema hematopoyético está formado por multitud de tipos celulares con funciones muy especializadas. Muchas de estas células presentan una vida media corta y necesitan ser repuestas constantemente. Un ser humano promedio requiere aproximadamente cien mil millones de nuevas células hematopoyéticas cada día. La continua producción de estas células depende del proceso de hematopoyesis. Durante el desarrollo embrionario la hematopoyesis tiene lugar en islotes sanguíneos y posteriormente en el hígado y en el bazo fetal, pero tras el nacimiento esta función la asume gradualmente la médula ósea (Orkin and Zon, 2008). En médula ósea se generan todas las células de la sangre y del sistema inmune, excepto las células T, que terminan de diferenciarse en el timo, a partir de precursores de médula ósea (Kawamoto and Katsura, 2009). Además de la hematopoyesis, en médula ósea se generan las células estromáticas mesenquimales como hueso, cartílago y grasa, a partir de las células madre mesenquimáticas.

El proceso de hematopoyesis depende de la presencia de células madre hematopoyéticas (HSC). Estas células tienen la capacidad de auto renovarse y de diferenciarse a los distintos linajes de células sanguíneas y del sistema inmune. Las HSCs son Lin^{neg} Sca-1^{pos} cKit^{pos} (LSK), no expresan los marcadores de linaje que expresan las células diferenciadas y expresan los marcadores Sca-1 y cKit. Sin embargo, esta población LSK es muy heterogénea e incluye tanto células HSC como progenitores multipotentes (MPPs) descendientes de las HSCs. Los MPPs han perdido la capacidad de autorenovarse pero conservan la potencialidad de diferenciarse a todos los linajes. Estos dan lugar a los progenitores comunes del linaje mieloide (CMPs), y a los progenitores comunes al linaje linfoide (CLPs). Los CMPs son precursores, por un lado, de los progenitores del linaje megacariocito/eritroide (MEPs), que dan lugar a los megacariocitos que liberan las plaquetas y a los eritrocitos; y, por otro lado, a los progenitores del linaje granulocítico/monocítico (GMPs), que dan lugar a los granulocitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos) y a los monocitos (macrófagos). Los CLPs son precursores del linaje linfoide y dan lugar a las células B, células T y células NK (Seita and Weissman, 2010) (Figura 1.5). Durante la

linfopoyesis B las células CLP se diferencian en primer lugar a células pre + pro B y posteriormente a células B inmaduras, estas células migran a órganos secundarios como el bazo donde alcanzan su maduración final (Bockstal et al., 2011). En cuanto a las células dendríticas, su posición en este modelo es interesante, pues ante los estímulos adecuados pueden diferenciarse tanto a partir de los CLPs como a partir de los CMPs. También existen evidencias de que algunos MPPs pueden diferenciarse directamente a MEPs sin pasar por los CMPs, (Seita and Weissman, 2010). Esto es muestra de la plasticidad celular que caracteriza a las células indiferenciadas.

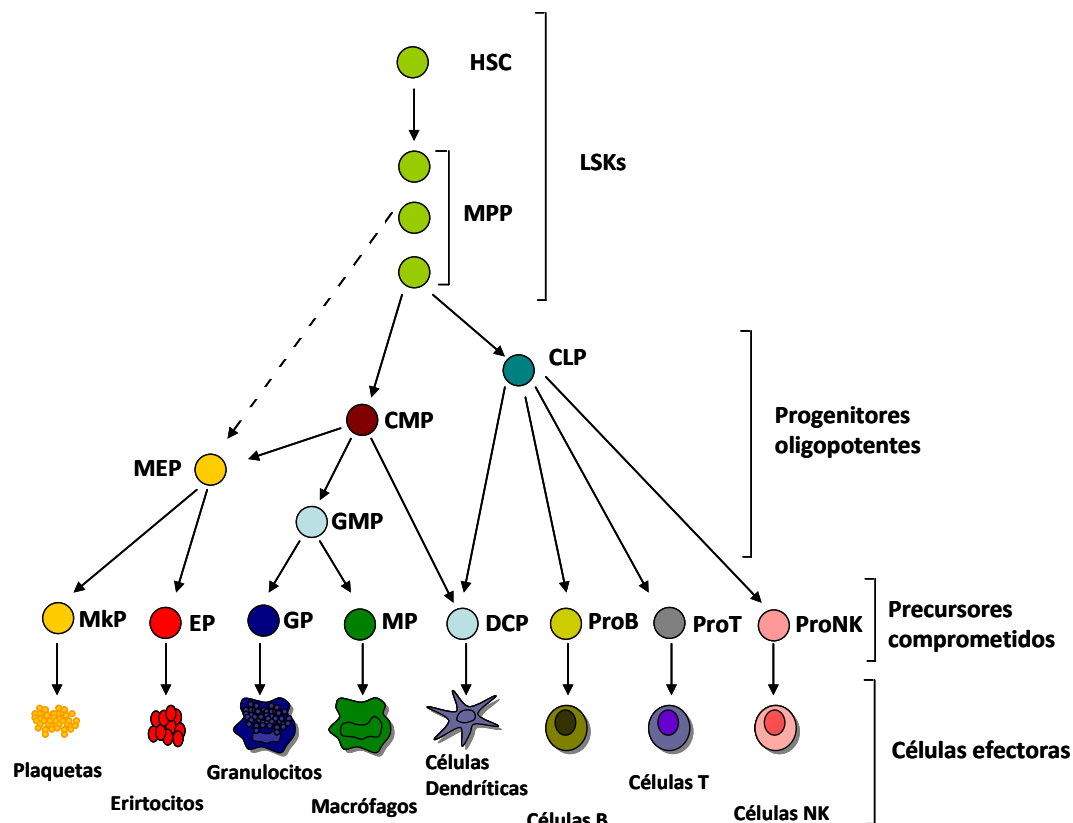


Figura I.5. Esquema de la hematopoyesis. Modificado de (Seita and Weissman, 2010).

La adopción de un determinado linaje por las células indiferenciadas requiere que estas sean competentes para responder a las señales de inducción de un linaje específico y que se encuentren en el entorno en que estas señales estén presentes. Tales progenitores dan lugar, entonces, a células cuya diferenciación posterior puede ser dependiente de señales de inducción que no estén presentes en el entorno local, lo que conllevaría a la migración de las mismas a un nuevo entorno. Esto se repite varias veces durante la diferenciación de un linaje concreto de células y vinculado a este proceso está la pérdida de la capacidad de responder a señales de inducción de otro linaje alternativo (Bhandoola et al., 2007).

Hematopoyesis e infección

Las HSC repueblan el sistema inmune en situaciones fisiológicas pero también en situaciones de estrés, produciéndose en cada caso resultados diferentes. Una infección es un factor natural de estrés para el sistema hematopoyético, en el cual, las células del sistema inmune desaparecen en la lucha contra patógenos, ya sea por movilización a los sitios de infección o por apoptosis, y la homeostasis del sistema depende de la repoblación de estas células efectoras por precursores hematopoyéticos. Por esa razón durante la exposición a agentes patogénicos la hematopoyesis puede producir poblaciones celulares en proporciones diferentes de las que se generan en condiciones fisiológicas. La hematopoyesis no es un proceso estático sino dinámico y sensible a ser regulado por factores ambientales (Boiko and Borghesi, 2012; King and Goodell, 2011).

Numerosos estudios en bacterias, hongos y virus muestran que tanto las HSCs como otros precursores responden a las infecciones sistémicas expandiéndose, movilizándose y diferenciándose. Por ejemplo, la infección con *Escherichia coli* (*E. coli*) genera una expansión significativa de células LSK, que también presentan más CFU-GM que las LSKs provenientes de ratones sin infectar (Zhang et al., 2008). También la infección *in vitro* con *Candida albicans* (*C. albicans*) induce la expansión y diferenciación de las HSCs (Yanez et al., 2009), al igual que la infección con *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y en modelos de infección polimicrobiana, como la ligación cecal (Scumpia et al., 2010), o en infecciones víricas, como la del virus *Vaccinia*, donde también se ha descrito una aceleración en la diferenciación de los CMPs a células mieloides más maduras y un incremento en el número de CLPs (King and Goodell, 2011; Singh et al., 2008).

Por otro lado, se ha descrito, que algunas infecciones generan disfunciones de la médula ósea y fenómenos de supresión de la hematopoyesis (generalmente de la mielopoyesis, la eritropoyesis y la linfopoyesis B). Ese es el caso de las infecciones con las bacterias intracelulares *Anaplasma* (Johns et al., 2009), *Ehrlichia* (MacNamara et al., 2009) y *Listeria* (Serbina et al., 2009); también de numerosas infecciones virales (como la infección por el virus influenza, el virus del dengue, citomegalovirus y el virus de la inmunodeficiencia humana) (Rosenfeld and Young, 1991); y de las infecciones por protozoos parásitos, como *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) (Bockstal et al., 2011; Stijlemans et al., 2010) y *T. cruzi* (Marcondes et al., 2000; Zuniga et al., 2005).

Estas disfunciones en la hematopoyesis en médula ósea pueden deberse a la movilización de los progenitores a la periferia (Shahbazian et al., 2004), a un incremento en su tasa de apoptosis (Mori et al., 1997), a una disminución en su tasa de proliferación (Davis and Zauli, 1995) o a un bloqueo en su diferenciación (Rodriguez et al., 2009).

Una supresión en la hematopoyesis normalmente resulta deletérea ya que suele ser causa de citopenias, como anemia y trombocitopenia en los casos de supresión del linaje eritroide

(Stijlemans et al., 2010), y defectos en la respuesta humoral en los casos de supresión de la linfopoyesis B (Borrow et al., 2005).

En un estudio donde los ratones fueron infectados mediante inyección intrapulmonar con *E. coli* se detectó que la expansión de las LSKs, mediada por la infección por este patógeno, se daba incluso en ausencia de citopenias periféricas. Esto sugería que los progenitores hematopoyéticos eran capaces de responder directamente a una infección, anticipándose a las necesidades celulares (Shahbazian et al., 2004).

No está bien definido como puede darse la detección de la infección por parte de las HSC y demás precursores hematopoyéticos. Se ha descrito la infección directa por parte de algunos virus (Parvovirus B19, citomegalovirus, virus de la hepatitis B, virus del dengue) de las células progenitoras de médula ósea, que podría causar pérdida o deterioro funcional de estas (Borrow et al., 2005). También existen ejemplos de infección de las células estromáticas de médula ósea, como en el caso de la infección por *Leishmania donovani*, donde la infección de estas células parece regular positivamente la mielopoyesis (Cotterell et al., 2000) o en la infección por citomegalovirus donde, por el contrario, la infección parece alterar los nichos de diferenciación y suprimir la mielopoyesis (Simmons et al., 1990).

También se han observado mecanismos de regulación de la hematopoyesis dependientes de la señalización a través de la detección directa de PAMPs por los TLRs presentes en las HSCs y demás precursores hematopoyéticos; como en los casos de infección por *C. albicans* (Yanez et al., 2009) y por el virus *Vaccinia* (Singh et al., 2008).

Por último, se ha descrito regulación indirecta de la hematopoyesis por una infección en ausencia de patógenos en la médula ósea (Johns et al., 2009). En una infección se liberan numerosos factores solubles capaces de regular la expansión y diferenciación de los diferentes linajes hematopoyéticos. Las citoquinas pro-inflamatorias, como TNF α (Rebel et al., 1999; Rezzoug et al., 2008) o IFNs tipo I y II (Baldrige et al., 2010; Essers et al., 2009; Hermesh et al., 2010), son cruciales para mantener la proliferación y diferenciación de las HSC tanto en condiciones fisiológicas como en respuesta a estrés. Sin embargo, una desregulación en la producción de estas citoquinas puede llevar al efecto contrario y causar supresión de la hematopoyesis a diferentes niveles (Hwang et al., 2006; Jacobsen et al., 1994; Sedger et al., 2002; Selleri et al., 1995).

Hematopoyesis extramedular

La hematopoyesis extramedular se define como la hematopoyesis que ocurre en órganos diferentes a la médula ósea. Este fenómeno se observa en diferentes condiciones como el desarrollo del feto, en respuestas inmunes normales y en algunas situaciones patológicas de

disfunción de médula ósea. Normalmente se da en el bazo y en el hígado donde se producen APCs, granulocitos, células B, células NK, eritrocitos y megacariocitos. Una inadecuada hematopoyesis extramedular, cuando ésta es requerida, puede dar lugar a la producción insuficiente de células de la sangre maduras, lo cual generaría citopenias; mientras que una excesiva hematopoyesis extramedular puede desencadenar enfermedades inflamatorias (Kim, 2010).

TIMOPOYESIS

El timo es el órgano linfoide primario donde se diferencian las células T. Anatómicamente se divide en una corteza exterior cubierta por una cápsula y en una médula interior. No contiene células madre hematopoyéticas con capacidad de autoregenerarse, si no que depende de progenitores originados en la médula ósea, que son liberados a la sangre y entran periódicamente en el timo a través de la unión cortico-medular (Ceredig and Rolink, 2002). Este aporte de progenitores está regulado por la disponibilidad de nichos vacíos en el timo (Wu, 2006). Las células T en proceso de maduración (timocitos), se pueden clasificar en función de la expresión de los antígenos CD4 y CD8 en las siguientes subpoblaciones: alrededor de un 5% son timocitos DN, cerca del 80% son timocitos DP, un 10 % son CD4 SP y alrededor de un 5% son CD8 SP (Ceredig and Rolink, 2002). El desarrollo de las células T en timo progresa a través de la diferenciación de los timocitos DN a timocitos DP y finalmente a timocitos CD4 SP o CD8 SP. Los timocitos DN se subdividen en 4 poblaciones en función de la expresión de los marcadores de superficie CD44 y CD25: los timocitos DN1 ($CD44^{pos} CD25^{neg}$), los DN2 ($CD44^{pos} CD25^{pos}$), los DN3 ($CD44^{neg} CD25^{pos}$) y los DN4 ($CD44^{neg} CD25^{neg}$) (Porritt et al., 2004). Los precursores de médula ósea se encuentran entre los timocitos DN1. Esta población es bastante heterogénea y contiene progenitores con capacidad de proliferar y diferenciarse a todos los tipos de células T ($\alpha\beta$ y $\gamma\delta$) y también a células no T (células NK, células dendríticas del timo y un pequeño número de células B y de células mieloides). Las señales específicas de diferenciación a célula T aparecen cuando los timocitos proliferan y comienzan a expresar CD25 para entrar en la fase DN2. El compromiso con el linaje T se completa en el estadio DN3 donde se dan los procesos de recombinación somática del DNA en los locus β , γ y δ para expresar cadenas del TCR funcionales. Aquí se da el primer punto de control del desarrollo de las células T, ya que los timocitos en este estadio mueren si la recombinación no resulta exitosa y no consiguen expresar la cadena β del TCR en combinación con la cadena pre-T α para formar un pre-TCR estable (selección β). Los timocitos que superan este punto de control proliferan, reducen la expresión de CD25 y comienzan a reordenar los genes del locus de la cadena α del TCR cuya expresión se puede detectar a niveles muy bajitos en los timocitos DN4 (Taghon et al., 2006). La señalización por el pre-TCR induce la

rápida diferenciación de los timocitos DN4 a timocitos DP, en los cuales se da la mayor parte de la recombinación somática de la cadena α (Starr et al., 2003). Aquellas células que logran la correcta expresión de la cadena α intercambian el pre-TCR por el TCR y se convierten en timocitos DP TCR $\alpha\beta^{\text{low}}$ (Szondy et al., 2012).

Selección positiva

La expresión de la cadena α del TCR no es señal suficiente para que se de la finalización de la recombinación y la posterior diferenciación de los timocitos DP, sino que también se requiere el reconocimiento por parte del TCR $\alpha\beta$ de moléculas del MHC presentando un antígeno propio. A este proceso se le denomina selección positiva. En esta etapa los timocitos expresan el TCR pero permanecen de forma indiferenciada expresando altas concentraciones de recombinasa Rag, mientras migran por la corteza del timo buscando interacciones con moléculas del MHC- péptido presentadas por células del estroma, como las células epiteliales tímicas (TEC) o las células dendríticas (Griesemer et al., 2010; Starr et al., 2003; Szondy et al., 2012). Alrededor de un 95% de los timocitos DP, nunca presentan afinidad por el MHC-péptido con lo que no reciben una señal de rescate a través del TCR y mueren por desatención (traducción del inglés “death by neglect”) mediante apoptosis, mediada por glucocorticoides o por la interacción con diversos receptores de superficie celular, (Szondy et al., 2012). Una pequeña proporción de los timocitos DP logra señalizar por el TCR y el resultado de esta señalización es la supervivencia, la represión de Rag, la migración a la médula del timo y la diferenciación de los timocitos DP a timocitos CD4 SP o CD8 SP TCR $\alpha\beta^{\text{high}}$. El que un timocito DP se diferencie a CD4 SP o CD8 SP depende del tipo de MHC que reconoció su TCR (Griesemer et al., 2010; Starr et al., 2003).

Selección negativa

La selección negativa, también llamada delección clonal, es el proceso por el cual se eliminan los timocitos cuyo TCR presenta excesiva afinidad por una molécula de MHC presentando un antígeno propio. Este proceso se lleva a cabo principalmente en timocitos SP semimaduros en la médula del timo, ya que se requiere, a parte de la señalización por el TCR, la participación de factores coestimuladores procedentes de las APCs, más presentes en la médula que en la corteza (Griesemer et al., 2010; Sprent and Kishimoto, 2002). También la apoptosis puede ser inducida exclusivamente por señalización por el TCR, en ausencia de coestimulación, si la estimulación del TCR es lo suficientemente fuerte. Esta apoptosis, a diferencia de la que requiere de coestimulación, es dependiente de Fas (Griesemer et al., 2010; Kishimoto et al., 1998). La depleción exitosa de timocitos potencialmente autoreactivos requiere la representación completa en timo de todos los antígenos propios del organismo (TSA). La expresión de los

diferentes TSAs se lleva a cabo por las células TEC y es controlada por genes como AIRE cuya deficiencia en ratones y humanos da lugar a enfermedades autoinmunes. Las APCs adquieren los antígenos de las TECs medulares por diversos mecanismos como por fagocitosis de células TEC apoptóticas (Griesemer et al., 2010). Las células T auto reactivas que escapan a la periferia son suprimidas por las Tregs. Las Tregs naturales se generan en el timo a partir de timocitos que expresan un TCR con afinidad media-alta por el MHC-péptido propio, pero que son desviadas de la selección negativa para diferenciarse a Tregs (Griesemer et al., 2010).

Involución tímica

La involución tímica consiste en una disminución en la timopoyesis, durante la cual, el tamaño y la función del timo se reducen drásticamente, con cambios del orden de hasta un 95 %. Múltiples procesos como infecciones, envejecimiento, embarazo o estrés, desencadenan involución tímica. Existen varias hipótesis que pueden explicar las ventajas de este fenómeno durante estos procesos. La hipótesis metabólica, por ejemplo, sugiere que en situaciones de estrés nutricional (como las citadas previamente de embarazo, envejecimiento o infección) se fomenta la reducción de procesos de alto coste energético como la timopoyesis. Desde un punto de vista más inmunológico, una timopoyesis normal en situaciones como una infección podría generar situaciones de riesgo, ya que si los patógenos alcanzan el timo y son fagocitados por las APC tímicas se podría inducir tolerancia a la infección, ya sea por la generación de células Treg específicas de antígenos infecciosos o por la inducción de tolerancia a antígenos infecciosos durante la selección negativa (Dooley and Liston, 2012).

Por otro lado, también se ha especulado que la involución tímica es un proceso patológico que no ofrece ninguna ventaja si no que, al contrario, es causa de algunos fenómenos de inmunosupresión típicos en situaciones de estrés (Savino et al., 2007).

En cualquier caso, es un proceso reversible ya que el timo es capaz de sufrir numerosas rondas de depleción casi completa seguidas de una rápida restauración (Dooley and Liston, 2012).

MDSCs Y METABOLISMO DE LA L-ARG

Durante el proceso de mielopoiesis las HSCs se diferencian a CMPs que dan lugar a células mieloides inmaduras. Éstas últimas, en situaciones fisiológicas, migran a los diferentes órganos periféricos donde se diferencian a macrófagos, células dendríticas y/o granulocitos. Este proceso está regulado por una compleja red de factores solubles que incluyen citoquinas como GM-CSF, M-CSF, SCF, IL3, FLT3 y moléculas de superficie celular como Notch. Sin embargo, en ambientes tumorales o durante infecciones crónicas, trauma o sepsis, se producen alteraciones de estos factores solubles que pueden desencadenar la acumulación de estas células mieloides inmaduras, el bloqueo de su diferenciación a células maduras y la inducción de su activación. Estas células suelen exhibir capacidades inmunosupresoras y por eso se conocen como células mieloides supresoras (MDSCs).

Las MDSCs expresan los marcadores de superficie celular CD11b y Gr1, este último incluye los marcadores Ly6G y Ly6C (Figura I.6). En función de la expresión de estos marcadores se distinguen dos principales poblaciones de MDSCs: las MDSCs monocíticas ($CD11b^{pos}$ $Ly6G^{neg}$ $Ly6C^{high}$) que expresan STAT1 e iNOS, y producen altas concentraciones de NO y bajas concentraciones de ROS; y las MDSCs granulocíticas ($CD11b^{pos}$ $Ly6G^{pos}$ $Ly6C^{low}$) que expresan STAT3 y NADPH, y producen altos niveles de ROS, particularmente peroxinitritos, pero no de NO. Ambas poblaciones presentan alta expresión de Arg I (Gabrilovich and Nagaraj, 2009).

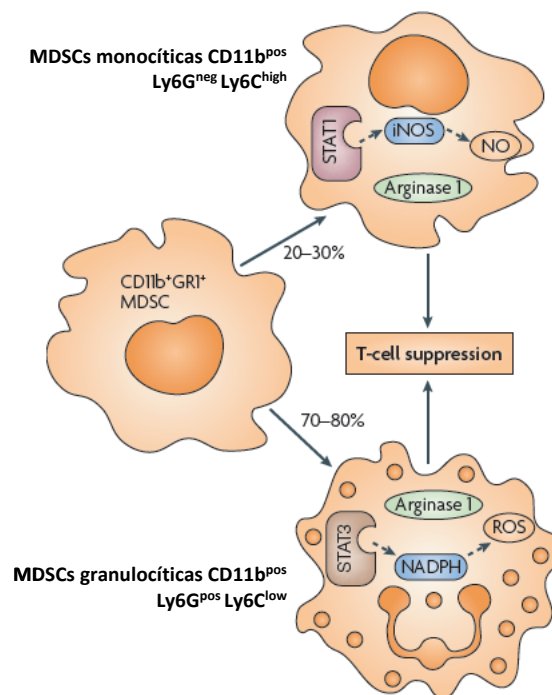


Figura I.6. Esquema de los diferentes subtipos de MDSCs. (Gabrilovich and Nagaraj, 2009)

Metabolismo de la L-arg en células mieloides

La Arg I forma parte del ciclo de la urea y cataliza la conversión de L-arg a L-ornitina y urea (Figura I.7). La L-ornitina, por un lado, es metabolizada por la enzima Ornitina Aminotransferasa (OAT) para dar lugar a la L-prolina, la cual es responsable de la síntesis de colágeno para la remodelación de la matriz extracelular; y, por el otro, es metabolizada por la enzima Ornitina Decarboxilasa (ODC) para dar lugar a las poliaminas, imprescindibles para la proliferación de todas las células eucariotas. Además, la L-arg también es metabolizada por la iNOS para la producción de citrulina y NO. Este último es importante en la destrucción mediante daño oxidativo de parásitos, bacterias, virus y células cancerígenas (Pegg, 2006; Popovic et al., 2007).

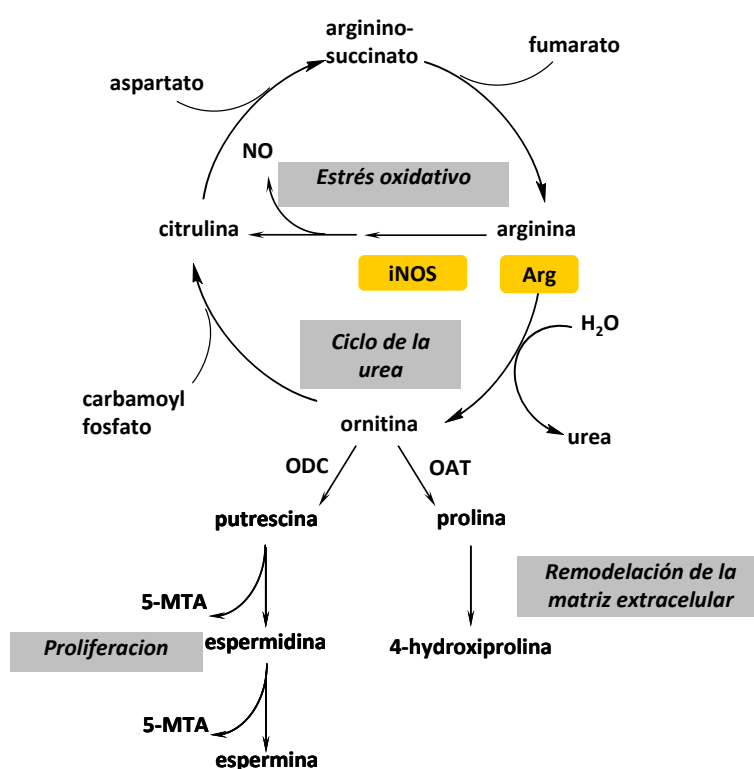


Figura I.7. Esquema del metabolismo de la L-arg

Existe una regulación cruzada entre los productos de las reacciones de la iNOS y de la Arg I. Se ha descrito que NOHA, una forma intermedia en la síntesis de NO, inhibe a la Arg I (Daghighi et al., 1994) y se ha demostrado que las poliaminas pueden estar afectando a la expresión de la iNOS (Mossner et al., 2001); además, la Arg I se ha implicado en la inhibición de la expresión de la iNOS vía depleción de la L-arg (El-Gayar et al., 2003; König et al., 2009; Lee et al., 2003; Mori, 2007). Por último, a pesar de que la constante de afinidad de la iNOS para la L-arg es 1000 veces menor que la de la Arg I, la Vmax de ésta es más de mil veces mayor que la de la iNOS, lo que

resulta en una utilización similar de L-Arg por parte de estas dos enzimas, y por tanto, una competencia entre ellas por el sustrato (Wu and Morris, 1998).

En condiciones de reposo, en ausencia de estimulación inmune, las células mieloides utilizan poca L-arg debido a que no expresan los transportadores de membrana de alta afinidad CAT ni las enzimas iNOS y Arg I. Tras la estimulación se incrementa el transporte de L-arg dentro de las células mieloides y su utilización, ya que se induce la expresión tanto de los CAT como de las enzimas que metabolizan la L-arg. Históricamente se ha considerado que las citoquinas llamadas proinflamatorias o Th1 (IL1, TNF α , IFN γ) inducen la expresión de la iNOS mientras que las llamadas citoquinas antiinflamatorias o Th2 (IL4, IL10, IL13, TGF β) inducen la expresión de la Arg I (Popovic et al., 2007). La observación de que las enzimas iNOS y Arg I se regulan por estímulos opuestos permitió a los investigadores determinar el estado de inflamación generado por una enfermedad mediante el análisis de la expresión de estas dos enzimas y separar a las células mieloides activadas en dos subtipos: los macrófagos inflamatorios, clásicamente activados o M1 (expresan iNOS) y los macrófagos antiinflamatorios, alternativamente activados o M2 (expresan Arg I) (Barbul, 1990).

Sin embargo, esta clasificación se complicó con el descubrimiento de que la activación de las células mieloides inmaduras para dar lugar a MDSCs puede inducir la expresión de estas dos enzimas simultáneamente y en altos niveles (Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Gallina et al., 2006).

Inmunosupresión debida a la actividad Arg I

La actividad sostenida de la enzima Arg I en MDSCs resulta en la disminución de la concentración del aminoácido L-arg en el microambiente celular (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Este aminoácido es considerado en mamíferos un aminoácido semi-esencial o esencial condicional, ya que se requiere un aporte extra en la dieta en situaciones de estrés como embarazo, trauma o infección, en las cuales los requerimientos del aminoácido exceden la capacidad productora del organismo (Bronte and Zanovello, 2005).

Los organismos unicelulares reducen los nutrientes del medio exterior como estrategia para regular la proliferación de células que compiten por un mismo nicho. De hecho, la familia de las Arginasas está muy conservada con este fin entre las diferentes especies de seres vivos, donde bacterias y parásitos explotan los efectos de la disminución de la concentración de L-arg del medio exterior como estrategia de supervivencia (Bronte and Zanovello, 2005). Por ejemplo, *H. pylori* expresa Arginasa de forma constitutiva, la cual, consume la L-arg del medio extracelular y reduce la producción de NO (agente antibacteriano) por macrófagos en cultivo. Bacterias deficientes en el gen de la Arginasa son susceptibles a morir por la acción de macrófagos activados (Gobert et al., 2001).

Los organismos superiores siguen estrategias similares y también utilizan el control del metabolismo de aminoácidos para limitar la expansión no deseada de células en proliferación. Ese es el caso de las MDSCs, donde la actividad sostenida de la Arg I lleva a consumir la L-arg del medio extracelular y las bajas concentraciones de L-arg inhiben la proliferación de las células T, a través de varios mecanismos. Por un lado, un déficit de L-arg afecta a la expresión de la cadena ζ del CD3 y bloquea la re-expresión del TCR después de su internalización tras la estimulación con un antígeno (Rodríguez et al., 2002; Taheri et al., 2001). En un modelo murino de carcinoma de pulmón se purificaron células mieloides, con altos niveles de expresión de Arg I, que eran capaces de consumir rápidamente la L-arg del medio extracelular e inhibir la re-expresión de la cadena ζ del TCR tras su internalización. Este mecanismo resultó ser relevante para la evasión de la respuesta inmune por parte del tumor, ya que, al administrar *in vivo* un inhibidor de la Arg I se consiguió ralentizar el crecimiento del tumor (Rodríguez et al., 2004). La cadena ζ del CD3 es el principal componente de transducción de señales del TCR y es necesario para el correcto ensamblaje del complejo del receptor. La pérdida de expresión de esta proteína es el único mecanismo arginasa-dependiente descrito hasta el momento que se ha demostrado tiene relación directa con la función de la célula T (Bronte and Zanovello, 2005). Por otro lado, se ha descrito que cuando las células T son estimuladas en ausencia de L-arg son incapaces de inducir la expresión de la ciclina D3 y la quinasa dependiente de ciclinas CDK4 con lo que se detiene el ciclo celular entre las fases G0-G1. Esto es dependiente de la ruta de estrés nutricional de GCN2 (Rodríguez et al., 2007).

En mamíferos existen dos mecanismos para detectar la disponibilidad de aminoácidos: uno dependiente de la quinasa GCN2 y otro dependiente de la quinasa mTOR. La ruta de GCN2 se basa en el hecho de que los niveles de tRNAs no cargados aumentan como consecuencia de una disminución en la concentración de aminoácidos. La quinasa GCN2 se une a los tRNAs no cargados y se activa, fosforilando e inactivando al factor eucariota de iniciación de la traducción eIF2 α . Esto da lugar a una parada transitoria de la traducción de algunas proteínas mientras que se fomenta la traducción de otras, como el factor de transcripción ATF4 que activa la expresión de genes relacionados con el estrés (Bronte and Zanovello, 2005). Por su parte, la ruta de señalización de mTOR integra el control de la disponibilidad de energía, nutrientes y factores de crecimiento para promover procesos anabólicos como la síntesis de ácidos grasos y suprimir procesos catabólicos como la autofagia. La señalización a través de mTOR depende de la presencia de aminoácidos específicos como leucina, arginina y metionina. La depleción de estos aminoácidos inhibe a mTOR (Peng et al., 2012). Cualquiera de estas dos rutas, o ambas, pueden mediar los efectos inmunosupresores causados por bajas concentraciones de L-arg.

También, como se ha mencionado previamente, una disminución de L-arg causa regulación negativa de la expresión de iNOS (Konig et al., 2009) además de la reducción en la producción de NO por competencia de sustrato (Wu et al., 1999).

Inmunosupresión debida a la actividad iNOS

El NO regula negativamente la señalización intracelular ya sea directamente por la s-nitrosilación de residuos de cisteína cruciales o indirectamente por la activación de la guanilato ciclasa soluble y la quinasa dependiente de GMP cíclico.

La supresión de la proliferación de las células T mediada por NO se asocia al bloqueo de la cascada de señalización del receptor de la IL2 (Bingisser et al., 1998). También existen evidencias de que el NO afecta a la producción de IL2 por parte de los linfocitos activados (Fischer et al., 2001). Por otro lado se ha observado un efecto directo pro-apoptótico en timocitos y células T maduras expuestas a altas concentraciones de NO (Gordon et al., 2001; Li et al., 2005; Migita et al., 2003; Zhou et al., 2000).

Inmunosupresión debida a Arg I e iNOS en cooperación

Cuando ambas enzimas Arg I e iNOS están activadas en la misma célula o en el mismo microambiente celular el consumo de L-arg es mucho mayor y esto trae como consecuencia (además de los efectos descritos debido a las bajas concentraciones de L-arg) que los dominios reductasa y oxigenasa de la iNOS transfieran electrones al co-sustrato O_2 para producir aniones superóxido O_2^- que pueden reaccionar con otras moléculas como el NO para generar RNOS como peroxinitritos ($ONOO^-$) y ROS, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas especies tienen multitud de efectos inhibitorios en las células T (Bronte et al., 2003; Xia and Zweier, 1997).

Se ha demostrado que la actividad combinada de Arg I e iNOS es importante para la actividad supresora de las células mieloides $CD11b^{pos}$ infiltrantes de tumores (Kusmartsev and Gabrilovich, 2005) o las células $CD11b^{pos} Gr1^{pos}$ aisladas de bazo de ratones con tumores subcutáneos o crónicamente infectados con helmintos (Bronte et al., 2003; Brys et al., 2005). La co-expresión de las enzimas iNOS y Arg I podría utilizarse como marcador molecular de la actividad inmunosupresora de MDSC (Bronte and Zanoello, 2005).

OBJETIVOS

Se ha descrito que la fase aguda de la infección por *T. cruzi* está asociada a disfunciones hematológicas, como anemia, trombocitopenia y leucopenia; y a alteraciones en órganos del sistema inmune, como esplenomegalia y atrofia de timo. Nosotros planteamos que este tipo de anomalías podrían tener como origen, o ser debidas al menos en parte, a alteraciones en el proceso de la hematopoyesis durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*. Por esa razón nos planteamos como objetivo:

1. Determinar las posibles alteraciones que sufre la hematopoyesis durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, mediante el estudio de diferentes poblaciones celulares participantes de la hematopoyesis en médula ósea, timo y bazo.

Por otro lado, durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* también se han descrito fenómenos de inmunosupresión. En nuestro laboratorio, hemos observado la presencia de MDSCs en bazo y en corazón. Estas células son capaces de suprimir la respuesta de las células T por mecanismos dependientes del metabolismo de la L-arg. Para profundizar en este fenómeno nos planteamos los siguientes objetivos:

2. Analizar la presencia de MDSCs en diferentes órganos del sistema inmune a lo largo de la fase aguda de la infección por *T. cruzi*
3. Estudiar las alteraciones del metabolismo de la L-arg durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*.
4. Analizar los efectos que tiene el suplemento de L-arg en la fisiopatología de la fase aguda de la infección por *T. cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelos murinos de infección

Se utilizó la cepa Y de *T. cruzi* (obtenida del Dr. John David, Departamento de Medicina, Escuela Médica de Harvard de Boston, Massachusetts, EEUU).

Los tripomastigotes sanguíneos fueron mantenidos de forma rutinaria, infectando ratones genéticamente deficientes en la expresión del receptor de IFN γ (129 Ifngr^{tm1Agt}/J) (Huang et al., 1993) y purificando los parásitos de su sangre. Los ratones 129 Ifngr^{tm1Agt}/J fueron un regalo de Manfred Kopf (Instituto de Inmunobiología Max-Planck, Friburgo, Alemania). Para la realización de los experimentos se utilizaron ratones hembra, de 6-8 semanas de edad, BALB/c y C57BL/6 (obtenidos de Laboratorios Harlan, Interfauna Ibérica, o de Charles River) y ratones genéticamente deficientes en la expresión de IL6 (obtenidos del laboratorio Jackson, Bar Harbor, EEUU). Los ratones fueron infectados con 2000 tripomastigotes/ratón mediante inyección intraperitoneal. La parasitemia fue monitorizada cada 2 días mediante el conteo al microscopio óptico de 50 campos (400x) de una extensión de 5 μ l de sangre obtenida de la cola de los ratones. El score clínico se determinó evaluando de forma visual parámetros como postura encorvada, pelo del lomo erizado, actividad y control de esfínteres; asignando un valor numérico, siendo 0 el valor mínimo de signos de enfermedad y 4 el valor máximo. Los días post-infección indicados los animales fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂ o dislocación cervical para la extracción de los diferentes tejidos.

En los experimentos correspondientes se suplementó L-arg (L-arginine monohydrochloride, Sigma –Aldrich), en el agua de bebida cada dos días, a una concentración final de 3,75 mg/ml o mediante inyección intraperitoneal (20 mg/Kg ratón) en PBS, a diario. El inhibidor específico de la iNOS 1400W (Sigma) fue administrado a diario mediante inyección intraperitoneal, en dosis de 20 mg/Kg ratón, en PBS.

Los ratones fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos y alimentados *ad libitum* en el animalario del Centro de Biología Molecular (CBMSO) o en el animalario de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba CIBICI- CONICET (Argentina). Su manipulación y cuidado se realizó según la normativa de bioética europea (Convención 1986) y Argentina vigentes, respectivamente.

Suspensiones celulares de esplenocitos, timocitos y células de médula ósea

La generación de las distintas suspensiones celulares se llevó a cabo mediante la extracción aséptica de los distintos órganos. En el caso de la médula ósea, esta se obtuvo de los fémures y tibias de las dos patas traseras. Los tejidos se mantuvieron a 4°C en medio de cultivo RPMI (Gibco, Grand Island, NY) suplementado con FCS (5%) o en PBS hasta su disgregación mecánica a través de filtros de nylon de 40 μ m (Falcon). En algunos casos se procedió a la lisis de eritrocitos

de las suspensiones celulares por lisis hipotónica mediante la incubación de las células en tampón de lisis (tabla 1) durante 1 min, en hielo. Las células se lavaron con PBS a 4°C y se procesaron para citometría de flujo, extracción de proteínas, extracción de RNA o *sorting*, según el experimento. Para algunos experimentos las células fueron cultivadas en RPMI a 37°C y 5% CO₂.

Citometría de flujo

Se llevó a cabo la tinción superficial de las células, de las suspensiones celulares, en placas de 96 pocillos con fondo en “V”, o directamente en tubos de CF. Se bloquearon los receptores Fc mediante la incubación de las células con el anti-CD16/CD32 (Mouse BD *Fc Block*) a 4°C durante 10 min. Las suspensiones celulares fueron incubadas con los correspondientes anticuerpos conjugados a fluorocromos o con los anticuerpos biotinilados (tabla 2) en PBS-*staining* (tabla 1), durante 20 min a 4°C y en oscuridad. Las células fueron lavadas en PBS-*staining* e incubadas con estreptavidina conjugada a fluorocromos 20 min, a 4°C y en oscuridad, en los casos que correspondía. Las suspensiones celulares fueron fijadas con paraformaldehído 1% en PBS durante 20 min a 4°C y en oscuridad. Las muestras fueron procesadas en el citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences) y los datos obtenidos fueron analizados con el programa FlowJo (TriStar, Ashland, OR, USA).

La tinción de Linaje (Lin) para el marcaje de HSC y progenitores oligopotentes de médula ósea se realizó utilizando los anticuerpos conjugados con PE contra CD4, CD8, B220, CD11b, Gr1 y Dx5 (tabla 2).

La tinción de Linaje (Lin) para el marcaje de timocitos DN en timo se realizó utilizando los anticuerpos conjugados con PE contra CD4, CD8, B220 y CD11b (tabla 2).

Análisis de expresión de proteínas por *western blot*

Los extractos proteicos de corazón, timo y bazo fueron obtenidos mediante disrupción mecánica utilizando un homogeneizador PT 1300 D (Kinematica Polytron, Fisher Scientific) en tampón de lisis de extracción de proteínas sin detergente (tabla 1) y posterior incubación en tampón de lisis de extracción de proteínas (tabla 1) durante 20 min a 4°C.

Los extractos proteicos de esplenocitos, timocitos y células de médula ósea se obtuvieron mediante la incubación de las suspensiones celulares en el tampón de lisis de extracción de proteínas, 20 min a 4°C.

Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante el método BCA de Pierce, utilizando la proteína BSA para realizar la curva estándar.

Los análisis por *western blot* se llevaron a cabo mediante la separación, por electroforesis desnaturalizante en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 10-50 µg de los extractos proteicos (previamente hervidos en tampón de carga reductor), y la posterior transferencia a una membrana de Nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham Biosciences) en cámara húmeda con Tris-glicina 20% (v/v) metanol, durante 90 min. Se llevó a cabo el bloqueo mediante la incubación de las membranas en tampón TBS (tabla 1) al 5% de leche o 5 % de BSA, durante 1h, a temperatura ambiente y con agitación. Posteriormente las membranas fueron incubadas alrededor de 16h (*over night*) a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos a las concentraciones indicadas en la tabla 2 en tampón de bloqueo. Tras sucesivos lavados de la membrana en tampón TBS-T (tabla 1), estas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa. La detección se realizó con el reactivo Supersignal (Pierce) y se llevó a cabo la exposición fotográfica.

Análisis de mRNAs por RT-PCR cuantitativa

La extracción del RNA total se llevó a cabo mediante la disrupción mecánica de los tejidos en TRIzol (Invitrogen), utilizando un homogeneizador PT 1300 D (Kinematica Polytron, Fisher Scientific). Para el análisis por qPCR se llevó a cabo la transcripción reversa del RNA total usando el kit High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems. Life Sciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación se realizó utilizando las sondas TaqMan MGB (tabla 3) y el TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) en un ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems. Life Sciences). Las muestras fueron ensayadas por triplicado y la cantidad relativa (RQ) de la expresión de los genes se calculó como se describe en (Schmittgen and Livak, 2008). Las cuantificaciones se normalizaron respecto al gen ribosomal *18S*.

qPCR para la detección del parásito

Los corazones fueron perfundidos con PBS y 0,1% de heparina (1.000 U/ml) y se cortaron en trozos pequeños con un bisturí estéril. Se aisló el DNA con el kit *High PurePCR Template preparation Kit* (Roche). Para cuantificar el DNA de *T. cruzi*, se siguió el ensayo por qPCR descrito en (Piron et al., 2007). Se utilizó DNA purificado a partir de epimastigotes de la cepa Y para generar la curva estándar. Se cargaron 100 ng de DNA total del tejido cardiaco por cada reacción de qPCR y el gen murino de *Tnf* se usó como control de carga.

Microscopía de fluorescencia

Los órganos fueron extraídos de los ratones a los d.p.i. indicados, fueron fijados durante al menos 2h en una solución de PBS- paraformaldehído al 4% y se incubaron durante la noche en

una solución de PBS- sacarosa al 30% a 4-8°C, hasta que el tejido se sumergió en el fondo del tubo. Los tejidos fueron incorporados en criomoldes Tissue-Tek PTU (Sakura, Japón) donde se congelaron en O.C.T. (Tissue-Tek, Sakura, Japón) sobre nieve carbónica y se almacenaron a -80°C. Se cortaron secciones de 10 µm de espesor utilizando un criostato Leica CM1900. Los portaobjetos se fijaron en acetona durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron y se incubaron 10 min con NH₄Cl para eliminar la autofluorescencia. A continuación, se lavaron con PBS, se permeabilizaron con el tampón PBS-T (tabla 1) y se llevó a cabo el bloqueo en tampón de bloqueo de IF (tabla 1). Las muestras se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios diluidos en el tampón de bloqueo. Se utilizó un bolígrafo con tinta hidrófoba (Dako), para separar los distintos cortes en el portaobjetos cuando se utilizaban diferentes anticuerpos. Al día siguiente las muestras se lavaron en PBS y fueron incubadas con los anticuerpos secundarios diluidos en el tampón de bloqueo durante la noche a 4-8° C. Las muestras se lavaron con PBS y posteriormente con agua. Los núcleos se tiñeron usando 1 µg/ml de DAPI (268298, Merck). Por último se utilizó el reactivo Prolong Gold Antifade (Invitrogen) para montar los cortes que se mantuvieron a 4°C hasta la observación al microscopio. Se utilizó esmalte de uñas transparente para sellar las muestras. Los cortes teñidos se observaron con un microscopio de escaneo láser confocal, LSM710 acoplado a un microscopio Axioimager, M2 (Zeiss). Las micrografías fueron procesadas en el programa ZEN (Zeiss).

Ensayos de TUNEL

El ensayo TUNEL detecta células apoptóticas tardías mediante la acción de la enzima deoxidonucleótido transferasa terminal, que cataliza la incorporación de nucleótidos marcados sobre los cortes del DNA característicos de las células que están sufriendo apoptosis.

Se llevaron a cabo ensayos de TUNEL, por citometría de flujo, sobre suspensiones celulares de timocitos procedentes de ratones sacrificados a los d.p.i. indicados. Para ello, se utilizó el kit "*In situ cell death detection Kit, TMR red*" (Roche). Se siguió el protocolo para suspensiones celulares, especificado en las instrucciones del fabricante. Como control positivo se utilizaron células incubadas previamente con DNAasa I recombinante.

Por otro lado, se realizaron ensayos de TUNEL en cortes de tejido de timo para observación al microscopio de fluorescencia. Para ello se utilizaron los cortes de timo, obtenidos, como se ha indicado previamente en el apartado de Microscopía de Fluorescencia, de ratones BALB/c sacrificados a los d.p.i. indicados. También se utilizó el kit "*In situ cell death detection Kit, TMR red*" (Roche), en esta ocasión siguiendo el protocolo de marcaje de cortes de tejidos criopreservados. Posteriormente se tiñeron los cortes con los anticuerpos primario y secundario y se procesaron las muestras como se explica en el apartado de Microscopía de fluorescencia.

Purificación del infiltrado celular del corazón

Los corazones de 15 ratones BALB/c sacrificados a 21 d.p.i. fueron extraídos asépticamente, se perfundieron con 10 ml de solución de PBS - heparina 0,1%, y se mantuvieron en HBSS (Tabla 1) frío. Se agruparon, (máximo 4) en una placa de cultivo celular, se lavaron a fondo con HBSS y se desmenuzaron en trozos pequeños con una hoja de bisturí estéril. A continuación se transfirieron en el tubo gentleMACS tipo C con 4,7 ml de HBSS, se añadieron 300 µl de solución de colagenasa II (600 U/ml) y 10 µl de una solución de ADNasa I (60 U/ml). Las muestras se disgregaron en un *gentleMACS dissociator*, utilizando el programa *heart*, se incubaron 30 min a 37° C para terminar de disgregarse siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Para obtener una suspensión celular homogénea las muestras fueron filtradas a través de 70 µm. Se procedió a la lisis de los eritrocitos mediante incubación de las suspensiones en tampón de lisis hipotónico (tabla 1) durante 1 min, en hielo. Las células obtenidas fueron procesadas para citometría de flujo.

Aislamiento de células CD11b^{pos}Ly6G^{neg} y células Ly6G^{pos} del infiltrado inflamatorio del corazón

Las suspensiones celulares del infiltrado inflamatorio fueron procesadas para la separación magnética siguiendo las instrucciones de Miltenyi Biotec. En primer lugar se llevó a cabo el aislamiento de las células Ly6G^{pos}, mediante la incubación de la muestra con un anti Ly6G conjugado a microbeads (Miltenyi Biotec GmbH), se utilizaron columnas MACS LS y separadores magnéticos MACS (Miltenyi Biotec GmbH), siguiendo las instrucciones del fabricante. La fracción de células Ly6G^{neg} fue sometida a una segunda separación magnética mediante la incubación de estas con anti CD11b conjugado a microbeads (Miltenyi Biotec GmbH) y consiguiente procesamiento en columnas LS y separadores magnéticos MACS (Miltenyi Biotec GmbH) para la obtención de la fracción de células CD11b^{pos}Ly6G^{neg}. Las células obtenidas se utilizaron para análisis de proteínas por *western blot* y para llevar a cabo los ensayos de supresión de la proliferación de células T.

Sorting de células CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high}, células CD11b^{pos} Ly6G^{pos} Ly6C^{low} y células CD11b^{neg}Ly6C^{pos} de médula ósea y bazo

Las poblaciones CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high}, CD11b^{pos} Ly6G^{pos} Ly6C^{low} y CD11b^{neg}Ly6C^{pos} de médula ósea y bazo fueron purificadas de suspensiones celulares obtenidas de 5 ratones BALB/c, mediante *sorting* directo en un *FACS cell sorter Aria*, tras la tinción superficial de las células con los anticuerpos específicos que se usaron para citometría de flujo (tabla 2).

Ensayos de supresión de la proliferación de células T

Se obtuvieron las suspensiones de esplenocitos de ratones NI. En algunos experimentos se aislaron las células T utilizando el kit de *Pan T cell*, columnas LS y separador magnético de MACS, siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec). Se sembraron 200.000 células T, o esplenocitos totales, por pocillo, en placas planas de 96 pocillos. Por otro lado se añadieron las células purificadas de corazón, bazo o médula ósea, según el experimento (200.000 células/pocillo). Las células se estimularon con 5 µg/ml de anti-CD3 (clon 145 - 2C11, BD Pharmingen) y 1 µg/ml de anti-CD28 (clon 37.51, BD Pharmingen) o con 1 µg/ml de concanavalina A (Type IV-S γ-irradiated. C0412, Sigma-Aldrich). Las células fueron incubadas a 37 °C y 5 % de CO₂ en medio completo al 5% en SFB, pasadas 48h se añadió 1 µCi de timidina [³H] (Amersham, Little Chalfont, Reino Unido o PerkinElmer, Massachusetts, EE.UU.) a cada pocillo. Los cultivos se recogieron 18 horas más tarde y se congelaron a -70°C hasta su procesamiento. Para ello, las muestras de los cultivos se transfirieron a un filtro de fibra de vidrio utilizando un cosechador de placa de 96 pocillos. A continuación, una vez seco el filtro, se fundió a éste una película de parafina que contenía el líquido de centelleo (Wallac, Turku, Finlandia) y se dejó solidificar. Por último se utilizó el contador de centelleo Microbeta (Wallac, Turku, Finlandia) para medir la timidina [³H] incorporada en el DNA de las células.

Estudios metabólicos

En algunos experimentos la determinación de L-arg se realizó mediante cromatografía HPLC en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la UAM. Para ello los plasmas obtenidos fueron congelados inmediatamente a -80°C. Tras su descongelación a temperatura ambiente, los parásitos presentes en las muestras fueron inactivados a 50°C durante 30 min y las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm para eliminar los precipitados proteicos. Para la determinación de L-arg se analizaron 5 µl de cada muestra mediante cromatografía HPLC acoplada a un espectrofotómetro de masas *Triple Quadrupole* (Varian 1200L; Agilent Technologies). La concentración de L-arginina se calculó a partir de los datos de parte por millón (ppm) obtenidos por comparación con una curva estándar de L-arg.

En otros experimentos, los corazones y los plasmas, obtenidos de ratones NI y de ratones infectados a días 14 y 21 post-infección (n=6) fueron congelado inmediatamente a -80°C. Una vez recolectadas todas las muestras, se descongelaron a temperatura ambiente y se trocearon los corazones con una hoja de bisturí estéril. Para cada muestra de tejido se pesaron 80 mg y se añadieron 100 µl de PBS, se inactivó al parásito incubando las muestras de tejido así como 100 µl plasma de cada ratón a 50°C durante 30 min. Se descartó el PBS de la muestra de tejido y se añadió 1600 µl de *solvent A* (estándares proporcionados por Metabolon Inc, resuspendidos en

80% de metanol de grado HPLC, Sigma Aldrich 494291, CAS 67-56-1) al tejido. El plasma, se combinó con 450 μ l de *solvent B* (estándares proporcionados por Metabolon Inc, resuspendidos en metanol de grado HPLC, Sigma Aldrich 494291, CAS 67-56-1). Tras una incubación de 4-48 h a temperatura ambiente las muestras se almacenaron a -80°C hasta el momento de su envío en nieve carbónica a Metabolon Inc (Durham, NC, EE.UU). Allí se dividieron en partes iguales para el análisis en las plataformas de cromatografía gaseosa y espectrofotometría de masas (GC/MS) y cromatografía líquida y espectrofotometría de masas (LC/MS) de Metabolon Inc, incluyendo replicados técnicos de un *pool* homogéneo con pequeñas cantidades de todas las muestras (Matriz). La variabilidad de los instrumentos se determinó calculando la desviación estándar relativa (RSD) para los estándares internos añadidos a las muestras. La variabilidad global de las muestras se determinó mediante el cálculo de la mediana de las RSD para todos los metabolitos endógenos, presentes en el 100% de las muestras de la Matriz, que son replicados técnicos de las muestras del *pool*. Los valores se normalizaron en términos de *raw area counts*. Para cada carrera esto equivale a los datos crudos. Cada metabolito en *OrigScale* fue re-escalado para que la mediana fuera = 1 y se expresó como *imputed normalized counts* (INC).

Cultivo de tripomastigotes *in vitro* e Infección de células Raw 264.7

En primer lugar se produjeron tripomastigotes *in vitro* en cultivos de células epiteliales Vero (ATCC CCL-81). Estas fueron cultivadas en medio RPMI completo al 5% de FCS, a 37°C , en una atmósfera con 5% de CO_2 y fueron infectadas con parásitos purificados de sangre, o de otros cultivos de células Vero. Los tripomastigotes obtenidos del medio extracelular de las células Vero, 5 o 6 días después de la infección, fueron purificados mediante centrifugación a 150g, durante 2 min, para eliminar células muertas y agregados. Sólo las placas sin amastigotes extracelulares visibles o células muertas en el medio fueron seleccionados para los experimentos. Se verificó la pureza de los parásitos al microscopio y estos fueron contados utilizando cámaras de Neubauer.

Con los tripomastigotes obtenidos se infectaron las células Raw 264.7 (ATCC TIB-71) de macrófagos de ratón en una proporción 10:1, que fueron cultivadas un medio base RPMI completo al 1% en SFB sin L-arg, al que se fueron añadiendo cantidades crecientes del aminoácido. M0: [L-arg]=0 μM y M1: [L-arg]= 100 μM . En los pocillos correspondientes las células fueron estimuladas con IFN γ (50U/ml) y [LPS (1 μg /ml). Todos los puntos se llevaron a cabo por triplicado. A las 48h de incubación se tomó el sobrenadante del cultivo para medir la [NO $_2$] mediante el ensayo de Griess (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. A los 7 días de incubación se tomó de nuevo el sobrenadante para medir la [NO $_2$] y también para contar en cámaras de Neubauer los tripomastigotes recién producidos.

Análisis estadístico

Todos los datos se muestran como medias \pm SEM (error estándar de la media). "n" indica el número de ratones o réplicas biológicas de los datos mostrados. La significancia estadística fue evaluada mediante análisis *T de student*, cuando se comparaban dos grupos y mediante el test *one way ANOVA*, seguido de un *Tukey post-test*, cuando los grupos de muestras de un experimento se evaluaban a diferentes tiempos. Para los análisis de curvas de supervivencia se utilizó el test *Log-rank (Mantel-Cox)*. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa GraphPad Prism 5.00 (La Jolla, CA, EE.UU.).

TABLA 1 MATERIALES Y MÉTODOS

Tampón	Composición	Aplicación
PBS	NaCl 137mM, KCl 2,7mM, PO ₄ HNa212H ₂ O 8mM, PO ₄ H ₂ K 1,5mM pH 7,4	Diversas
PBS-T	PBS 0,1% Triton X 100	IHF
Tampón bloqueo IHF	PBS-T 5% BSA	IHF
TBS	5N de NaCl, 1M Tris pH 7,6	WB
TBS-T	TBS-0,1% Tween 20	WB
Tampón bloqueo WB	TBS-T 5% leche desnatada o 5% BSA	WB
Tampón de lisis para extracción de proteínas	PBS – 1% Tritón X 100 + 1 píldora inhibidores de proteasas/10ml (ref: 04 693 124 001, Roche) + 1 píldora inhibidores de fosfatasas/10ml (ref: 04 906 837 001, Roche)	Extracción de proteínas para WB
Tampón de lisis de eritrocitos	123mM NH ₄ Cl, 10mM CO ₃ HK, EDTA 0,1 M (pH 7,4) en agua destilada	Lisis de eritrocitos
Tampón de <i>sorting</i>	PBS 1mM EDTA, 25mM HEPES, 2% SFB	Purificación de poblaciones celulares por FACS <i>sorting</i>
HBSS (Ca²⁺ Mg²⁺)	1,26mM CaCl ₂ , 0,49mM MgCl ₂ , 0,41mM MgSO ₄ , 5,3mM KCl, 0,44mM KH ₂ PO ₄ , 4,17mM NaHCO ₃ , 137,93mM NaCl, 0,34mM Na ₂ HPO ₄ , 5,55mM glucosa en agua destilada	Purificación de células del infiltrado inflamatorio cardiaco
Medio completo RPMI	RPMI (1640) , SFB 5%, L-glutamina 2mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 1000 U/ml y aminoácidos no esenciales 0,1 mM	Cultivo

MATERIALES Y MÉTODOS TABLA 2

ANTICUERPOS	CLON	REFERENCIA	PROVEEDOR	APLICACIÓN	DILUCIÓN
anti CD11b Af. 647	M1/70	557686	BD	CF y <i>sorting</i>	1:250
anti CD11b PE	M1/70	557397	BD	CF	1:500
anti Ly6G PE Cy6	1A8	560601	BD	CF y <i>sorting</i>	1:250
anti Ly6C FITC	AL-21	553104	BD	CF y <i>sorting</i>	1:250
anti Gr1 PE	RB6-8C5	12-5931-81	eBioscience	CF	1:500
anti CD4 FITC	H129.19	553651	BD	CF	1:500
anti CD4 PE	(L3T4)	553049	BD	CF	1:500
anti CD8 APC	53-6,7	551162	BD	CF	1:500
anti CD8 PE	53-6,7	553032	BD	CF	1:500
anti CD25 APC	PC61,5	17-0251-82	eBioscience	CF	1:500
anti CD44 biotina	IM7	553132	BD	CF	1:500
anti Ter119 PE	TER-119	12-5921-81	eB	CF	1:500
anti CD71 FITC	C2	561936	BD	CF	1:500
anti B220 PE	RA3-6B2	553089	BD	CF	1:500
anti IgM biotina	eB121-15F9	13-5890	eBioscience	CF	1:500
anti CD49b PE	DX5	553858	BD	CF	1:500
anti cKit BV	2B8	562609	eBioscience	CF	1:500
anti Sca-1 PECy7	D7	25-5981-81	eBioscience	CF	1:500
anti Il7 R biotina	A7R34	13-1271-81	eBioscience	CF	1:500
Rat anti CD68		MCA1957GA	AbD Serotec.	IHF	1:200
Rabbit anti iNOS	M19	Sc-650	Santacruz Biotech.	IHF WB	1:150, 1:1000
Goat anti Arg I	V20	Sc-18354	Santacruz Biotech.	IHF WB	1:20, 1:1000
anti Rat IgG Af.488	policlonal	A-21208	Invitrogen	IHF	1:200
anti Goat IgG	policlonal	A-21431	Invitrogen	IHF	1:200
anti Rabbit IgG Af. 647	policlonal	A-31572	Invitrogen	IHF	1:200
Goat anti Actina	policlonal	Sc-1616	Santa Cruz Biotech.	WB	1:1000
Rabbit anti CD3 ζ		lab. Dr. Alarcon, CBMSO, Madrid, España		WB	1:1000
goat anti CD3 ε	M20	Sc-1127	Santa Cruz Biotech.	WB	1:300
Rabbit anti P70S6K-fosf	policlonal	9205	Cell signalling	WB	1:100
Rabbit anti eIF2α		Sc-11386	Santa Cruz Biotech.	WB	1:500
Rabbit anti-eIF2α-fosf		9721	Cell Signalling	WB	1:1000
anti Goat peroxidasa		A5420	Sigma	WB	1:20000
anti Rabbit peroxidasa		32460	Thermo Scientific	WB	1:1000
anti CD11b microbead		130-049-601	Miltenyi Biotec	SM	
anti Ly6G microbead		130-092-332	Miltenyi Biotec	SM	
PanTcell microbead		130-090-861	Miltenyi Biotec	SM	
Streptavidina APC-Cy7		554063	BD	CF	1:500

TABLA 3 MATERIALES Y MÉTODOS

CÓDIGO Sonda (A&B)	GEN	PROTEINA
Mm00440502_m1	<i>Nos2</i>	iNOS
Mm00801778_m1	<i>Ifng</i>	IFN γ
Mm00443258_m1	<i>Tnf</i>	TNF α
Mm00475988_m1	<i>Arg1</i>	Arg I
Mm00434204_m1	<i>Il13</i>	IL13
Mm00445259_m1	<i>Il4</i>	IL4
Mm 00475156_m1	<i>Foxp3</i>	Foxp3
Mm 01261022_m1	<i>Rorc</i>	Rorc γ
Hs 099999901_s1	<i>18S</i>	18S

RESULTADOS

ALTERACIONES EN LA HEMATOPOYESIS DURANTE LA FASE AGUDA DE LA INFECCIÓN POR *T. CRUZI*: MÉDULA ÓSEA Y BAZO

Los ratones desarrollan una fase aguda y crónica de la enfermedad de Chagas en cierto modo similar a la patología descrita en humanos. Sin embargo, a la hora de sacar conclusiones, hay que tener en cuenta que tanto las cepas de ratón como de parásito, al igual que el procedimiento de inoculación, influyen en el desarrollo de la infección. Nosotros, para la realización de la mayor parte de los experimentos, hemos utilizado el modelo de infección intraperitoneal de ratones BALB/c con 2.000 parásitos de la cepa Y de *T. cruzi*.

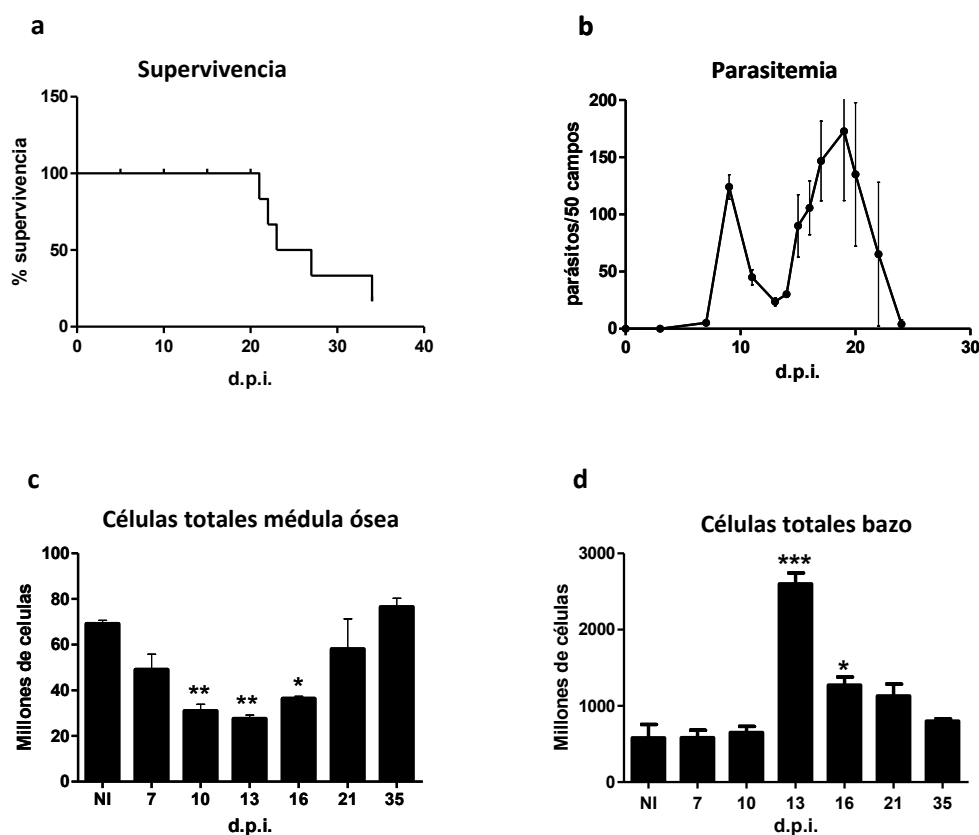


Figura 1: Parámetros generales de la infección por *T. cruzi* cepa Y y número total de células en médula ósea y bazo a lo largo de la fase aguda de la infección. Ratones BALB/c fueron infectados con la cepa Y. Se determinó la parasitemia cada 1-3 días y la supervivencia a diario. En los días post-infección indicados se extrajeron las médulas óseas y los bazos. **a)** Se muestra la curva de supervivencia (n=10) de un experimento representativo de, al menos, 6 experimentos independientes. **b)** Se muestran las medias \pm SEM (n=6) de las parasitemias de un experimento representativo de, al menos, 6 experimentos independientes. **c)** Se muestran las medias \pm SEM (n= 3) del número total de células de la médula ósea/ratón de un experimento representativo de, al menos, tres experimentos independientes. **d)** Se muestran las medias \pm SEM (n= 3) del número total de células del bazo/ratón de un experimento representativo de, al menos, tres experimentos independientes. Se llevó a cabo un análisis estadístico *one way anova*. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al número de células obtenidas de los ratones NI. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Los ratones BALB/c resultaron ser susceptibles a la infección, presentando alta mortalidad (Figura 1 a) y altas parasitemias desde el día 7 hasta el día 25 post-infección (Figura 1 b). Curiosamente, hacia el día 16 post-infección, cuando parecía que la parasitemia se estaba

controlando, esta volvió a aumentar en un segundo pico que, hemos observado, puede variar en intensidad de experimento a experimento, y cuando este es intenso, es pronóstico de mortalidad.

Para estudiar la hematopoyesis a lo largo de la fase aguda de la infección por *T. cruzi* decidimos centrarnos en la médula ósea, como principal tejido hematopoyético. Observamos que el número total de células de médula ósea disminuyó de forma significativa con la infección, llegando a reducirse en más de un 60% a día 13 post-infección, para recuperarse en su totalidad al final de la fase aguda, en los ratones supervivientes (Figura 1 c). Estos resultados están de acuerdo con los resultados obtenidos previamente con otras cepas del parásito (Marcondes et al., 2000; Zuniga et al., 2005) y sugieren que durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* la hematopoyesis en médula ósea podría estar viéndose afectada.

Por otro lado observamos esplenomegalia en bazo, que podría ser debida, en parte, a hematopoyesis compensatoria extramedular como la descrita en otros modelos (MacNamara et al., 2009) (Figura 1 d).

HSCs y progenitores oligopotentes

En primer lugar analizamos las células LSK, que incluyen células madre hematopoyéticas y progenitores multipotentes, y observamos que se produjo un incremento en el porcentaje de estas con la infección (Figura 1 a). En cuanto al número total de células, este no varió de forma estadísticamente significativa, aunque sí presentó cierta tendencia a aumentar durante la fase aguda para recuperar sus valores normales al final de esta, en los ratones supervivientes (Figura 2 c).

Por el contrario, observamos que los progenitores oligopotentes del linaje mieloide y eritroide (CMP) y los progenitores oligopotentes del linaje linfoide (CLP) disminuyeron de forma significativa a lo largo de la infección, tanto en porcentaje (Figura 1 a y b) como en número total de células (Figura 2 d y e). Podría ocurrir, que un precursor común a ambos linajes estuviera siendo afectado, dándose un bloqueo parcial en la hematopoyesis a partir de este punto, o que cada población estuviera sufriendo supresiones independientes.

Los CLPs aumentaron en gran medida al final de la fase aguda siendo más numerosos que en los ratones NI, probablemente para repoblar los órganos linfoides cuya celularidad se ve disminuida durante la infección, como es el caso del timo (de Meis et al., 2009).

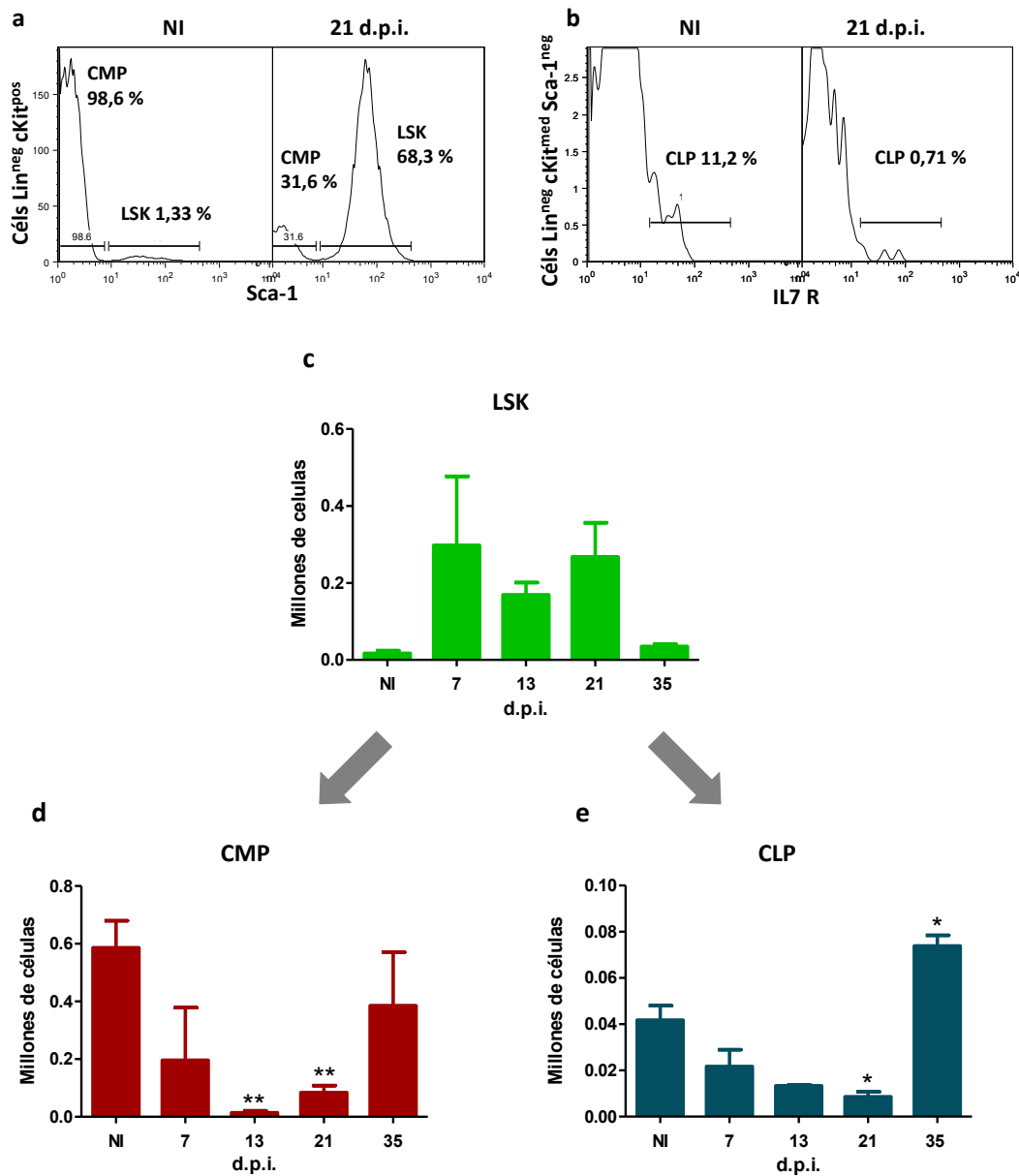


Figura 2. HSCs y Progenitores Oligopotentes. Se extrajeron las médulas óseas de los ratones los días post-infección indicados y se analizaron las diferentes poblaciones por citometría de flujo, como se explica en materiales y métodos. **a)** Ejemplo representativo de los porcentajes de células Sca-1^{pos} y Sca-1^{neg}, dentro de las células Lin^{neg} cKit^{pos}, correspondientes a las células LSK y CMP, respectivamente, de ratones NI y 21 d.p.i. **b)** Ejemplo representativo de los porcentajes de células IL7 R^{pos}, dentro de las células Lin^{neg} Sca-1^{neg} cKit^{med}, correspondientes a las células CLP, de ratones NI y 21 d.p.i. A continuación se muestran las medias \pm SEM (n= 3) del número total de células de cada población obtenidas por ratón, de un experimento representativo de dos experimentos independientes, de: **c)** células LSK: Lin^{neg} Sca-1^{pos} cKit^{pos}; **d)** células CMP: Lin^{neg} Sca-1^{neg} cKit^{pos} y **e)** células CLP: Lin^{neg} Sca-1^{neg} cKit^{med} IL7R^{pos}. Se llevó a cabo un análisis estadístico *one way anova*. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al número de células obtenidas de ratones NI.

* p<0,05, ** p<0,01.

Eritropoyesis

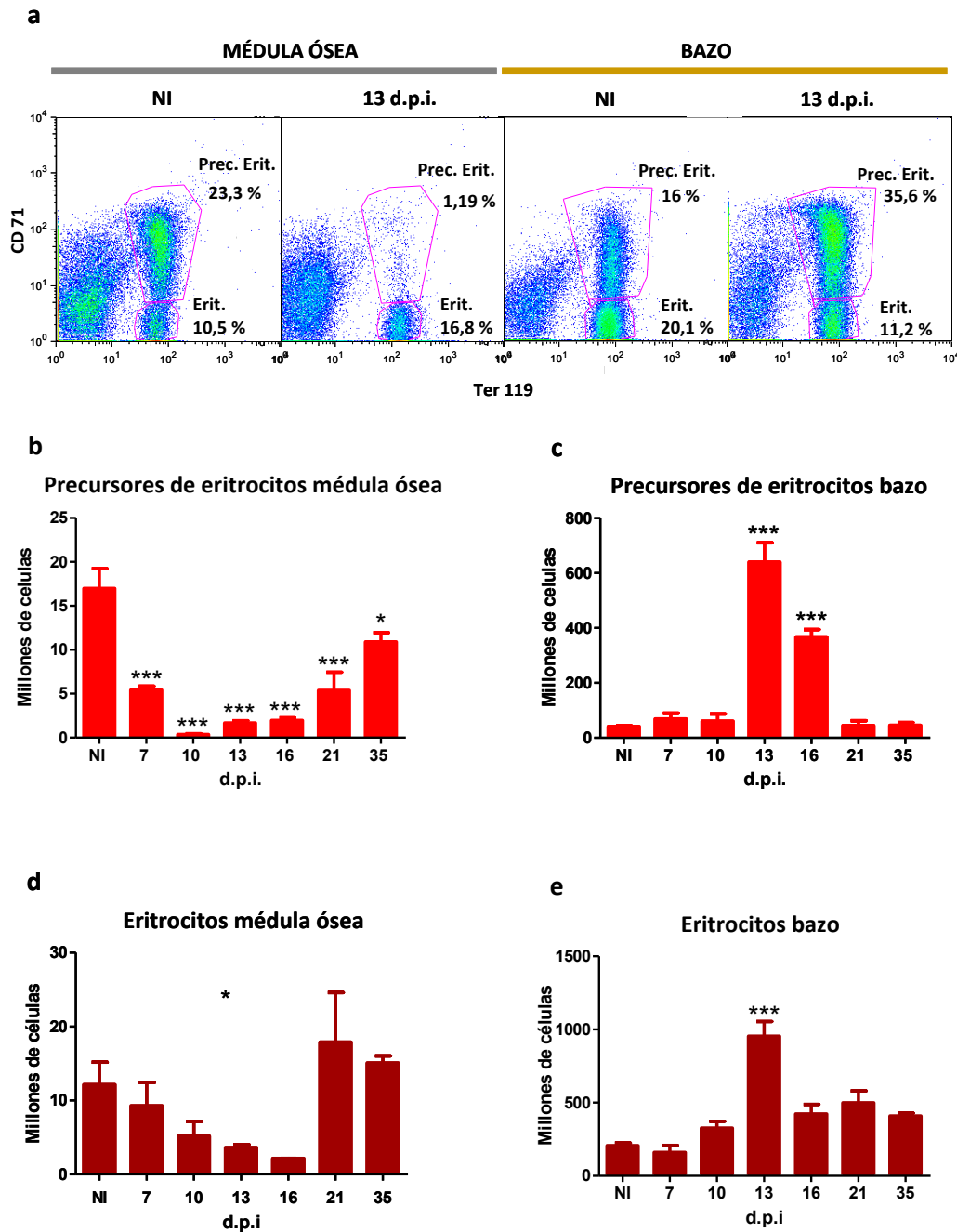


Figura 3. Eritropoyesis. Se extrajeron las médulas óseas y los bazo de los ratones los días post-infección indicados y se analizaron las diferentes poblaciones por citometría de flujo, como se explica en materiales y métodos. **a)** Ejemplo representativo de los porcentajes de células $CD71^{pos} Ter119^{pos}$ y $CD71^{neg} Ter119^{pos}$, correspondientes a los precursores de eritrocitos y eritrocitos maduros, respectivamente, de médula ósea y bazo. A continuación se muestran las medias \pm SEM del número total de células de cada población obtenidas por ratón ($n=3$), de un experimento representativo de dos experimentos independientes, de: **b)** precursores de eritrocitos de médula ósea: células $CD71^{pos} Ter119^{pos}$; **c)** precursores de eritrocitos de bazo: células $CD71^{pos} Ter119^{pos}$; **d)** eritrocitos de médula ósea: células $CD71^{neg} Ter119^{pos}$; **e)** eritrocitos de bazo: células $CD71^{neg} Ter119^{pos}$. Se llevó a cabo un análisis estadístico *one way anova*. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a las células de los ratones NI; excepto en (d), donde a pesar de que ningún día fue significativamente diferente al NI, el test determinó que el número de células variaba de forma significativa a lo largo del tiempo. * $p<0,05$ ** $p<0,01$ *** $p<0,001$.

También se observó una gran reducción (tanto en porcentaje como en número total de células) de los precursores de eritrocitos y de los eritrocitos maduros en médula ósea (Figura 3 a, b y c) que podría ser debida, al menos en parte, a la falta de los precursores previos CMP. Sin embargo también podría estar ocurriendo una supresión adicional de la eritropoyesis, ya que la hipoplasia de este linaje parece ocurrir antes en el tiempo y de manera más pronunciada que la de sus precursores CMP. Por otro lado se observó un incremento (tanto en porcentaje como en número total de células) de la eritropoyesis extramedular en bazo, probablemente para compensar la supresión de la eritropoyesis en médula ósea.

Linfopoyesis B

También las células pre + pro B y las células B inmaduras disminuyeron (tanto en porcentaje como en número total de células) en médula ósea a lo largo de la infección (Figura 4 a, b y c). Igual que en el caso anterior, esta reducción podría ser debida a la falta de precursores previos CLP y/o a una supresión adicional del linaje B. Se observó que a 21 d.p.i. las células B inmaduras ya se estaban recuperando mientras que sus precursores pre + pro B seguían a niveles bajos, lo cual, sugiere una supresión independiente de las células B inmaduras que se revierte antes que la que afecta a sus precursores pre + pro B. Una supresión de la linfopoyesis B debida a un incremento específico en la apoptosis de las células B inmaduras durante la infección por *T. cruzi*, ya ha sido descrita previamente ([Zuniga et al., 2005](#)).

Esta disminución de los precursores de células B correlacionó con la práctica desaparición de las células B maduras recirculantes (Figura 4 a y d) de médula ósea, reflejo de los bajos niveles de células B que habría en el torrente sanguíneo.

A 35 d.p.i., tanto las células pre + pro B como las células B inmaduras y las células B maduras recirculantes se recuperaron en médula ósea. Las células pre + pro B, al igual que ocurría con sus precursores CLP, alcanzaron un número mayor que el obtenido en los ratones NI.

Por otro lado, en bazo aumentó el número total de células B (Figura 4 e), esto podría deberse a una activación clonal secundaria y/o a linfopoyesis B extramedular.

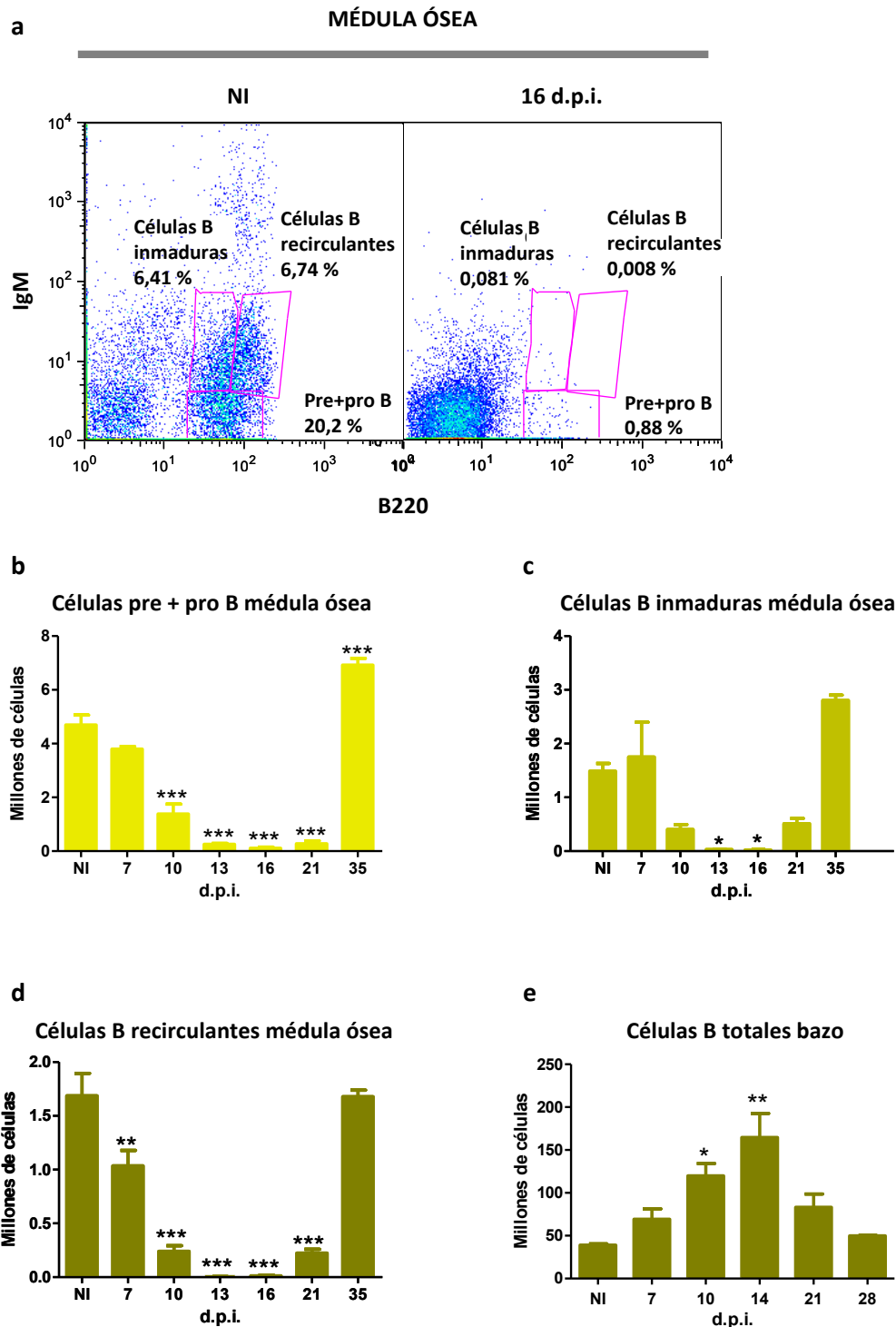


Figura 4: Linfopoyesis B. Se extrajeron las médulas óseas y los bazo de los ratones los d.p.i. indicados y se procesaron mas muestras para citometría de flujo como se explica en materiales y métodos. **a)** Ejemplo representativo de los porcentajes de células $\text{Lin}^{\text{pos}} \text{B220}^{\text{pos}} \text{IgM}^{\text{neg}}$, $\text{Lin}^{\text{pos}} \text{B220}^{\text{med}} \text{IgM}^{\text{pos}}$ y $\text{Lin}^{\text{pos}} \text{B220}^{\text{high}} \text{IgM}^{\text{pos}}$, correspondientes a las células pre + pro B, células B inmaduras y células B maduras recirculantes, respectivamente. A continuación se muestran las medias \pm SEM ($n=3$) del número total de células de cada población, de un experimento representativo de dos experimentos independientes, de: **b)** células pre + pro B $\text{Lin}^{\text{pos}} \text{B220}^{\text{pos}} \text{IgM}^{\text{neg}}$ de médula ósea; **c)** células B inmaduras $\text{Lin}^{\text{pos}} \text{B220}^{\text{med}} \text{IgM}^{\text{pos}}$ de médula ósea; **d)** células B maduras recirculantes $\text{Lin}^{\text{pos}} \text{B220}^{\text{high}} \text{IgM}^{\text{pos}}$ de médula ósea y **e)** células B totales B220^{pos} de bazo. Se llevó a cabo un análisis estadístico *one way anova*. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a las células de los ratones NI. * $p<0,05$ ** $p<0,01$ *** $p<0,001$.

Mielopoyesis

Las células mieloides CD11b^{pos} totales también disminuyeron (tanto en porcentaje como en número total de células) en médula ósea durante la fase aguda de la infección (Figura 5 a y b), sin embargo, mientras que la población mioide granulocítica CD11b^{pos} Ly6G^{pos} Ly6C^{low} disminuyó en los días 10 y 13 post-infección (Figura 5 a y d), la población mioide monocítica CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high} aumentó en el día 13 post-infección (Figura 5 a y c).

En bazo aumentaron (tanto en porcentaje como en número total de células) todas las poblaciones de células mieloides CD11b^{pos} (Figura 6 a y b), tanto las monocíticas (Figura 6 a y c), principalmente a 13 d.p.i., como las granulocíticas (Figura 6 a y d), a 16 y 21 d.p.i. Este incremento de células mieloides podría deberse a una mielopoyesis extramedular, como la descrita en otros modelos ([Mirkovich et al., 1986](#)).

Un incremento en la mielopoyesis, tanto en médula ósea como en bazo, podría servir para generar células mieloides maduras que ayudasen a destruir a los patógenos, sin embargo, si no se da la adecuada maduración de estas células se puede inducir la generación de MDSCs ([Kim, 2010](#)). Estas células se expanden en situaciones patológicas como cáncer, trauma o infección y se caracterizan por presentar un estado inmaduro pero a la vez activado y actividad inmunosupresora de la respuesta T. Los marcadores Ly6G y Ly6C son utilizados para distinguir entre MDSCs granulocíticas (CD11b^{pos} Ly6G^{pos} Ly6C^{low}) y MDSCs monocíticas (CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high}). Más adelante profundizaremos en el estudio de estas poblaciones.

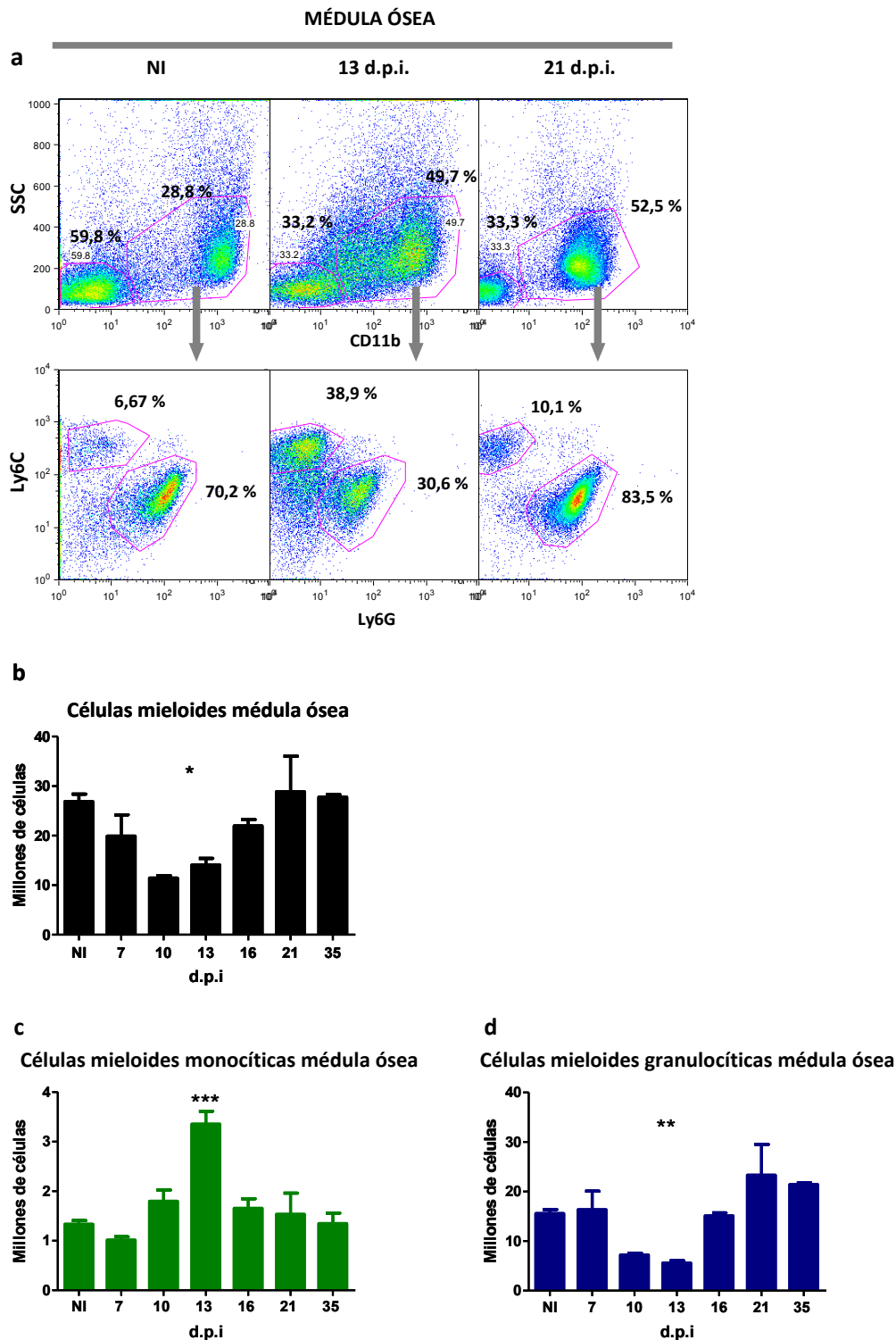


Figura 5. Mielopoyesis en médula ósea. a) Ejemplo representativo de los porcentajes de células mieloides CD11b^{pos} y dentro de estas, de las células monocíticas Ly6G^{neg} Ly6C^{high} y granulocíticas Ly6G^{pos} Ly6C^{low} de médula ósea. A continuación se muestran las medias \pm SEM del número total de células de cada población obtenidas por ratón (n= 3), de un experimento representativo de dos experimentos independientes de: **b)** células mieloides CD11b^{pos} de médula ósea; **c)** células mieloides monocíticas CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high} de médula ósea y **d)** células mieloides granulocíticas CD11b^{pos} Ly6G^{pos} Ly6C^{low} de médula ósea. Se llevaron a cabo análisis estadísticos *one way anova*. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al número de células obtenidas de los ratones NI; excepto en (b), dónde a pesar de que ningún día fue significativamente diferente al NI, el test determinó que el número de células variaba de forma significativa a lo largo del tiempo. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

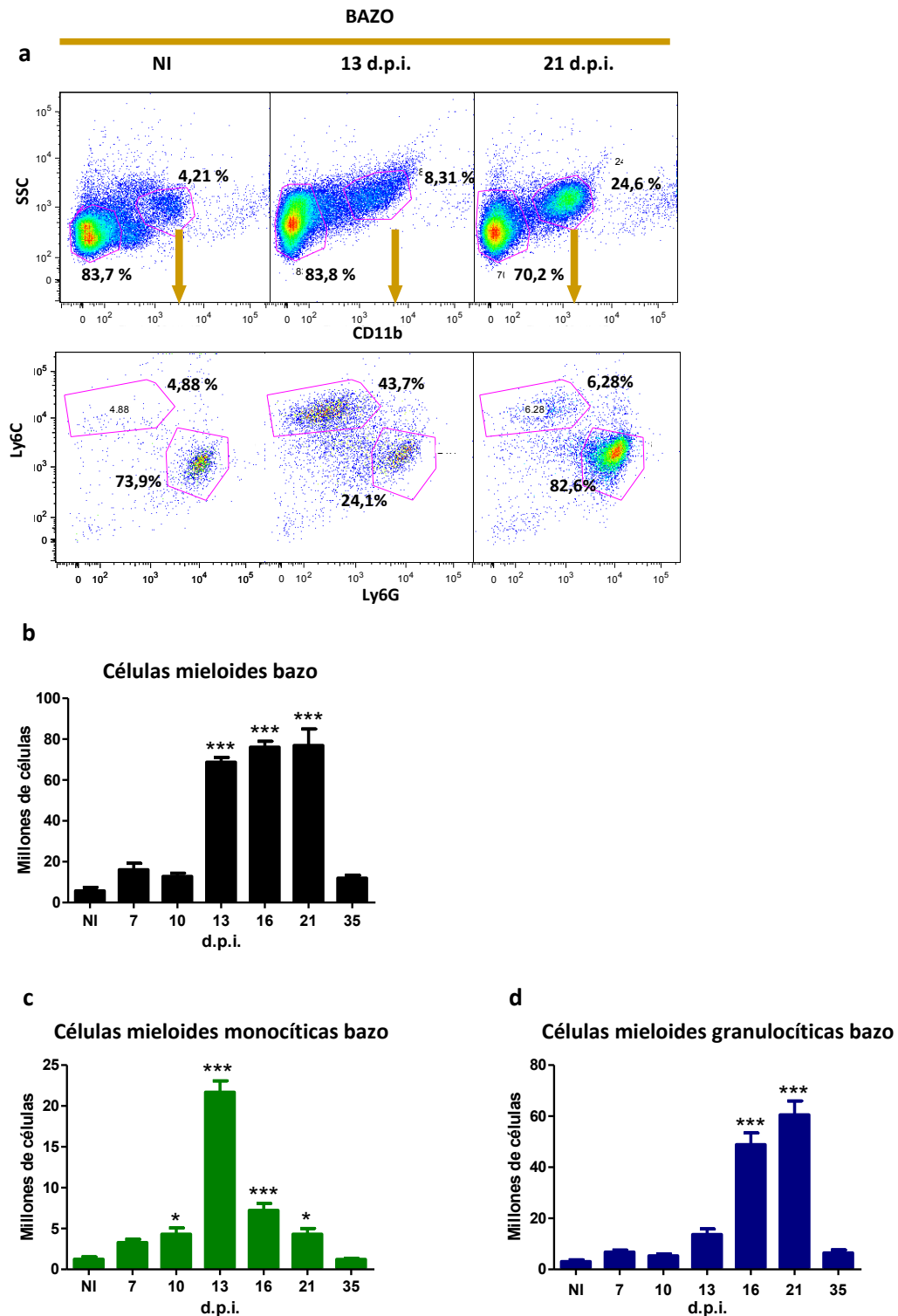


Figura 6. Mielopoyesis en bazo. a) Ejemplo representativo de los porcentajes de células mieloides $CD11b^{pos}$ y dentro de estas, de las células monocíticas $Ly6G^{neg} Ly6C^{high}$ y granulocíticas $Ly6G^{pos} Ly6C^{low}$, de bazo. A continuación se muestran las medias \pm SEM del número total de células de cada población obtenidas por ratón ($n = 3$), de un experimento representativo de, al menos, 5 experimentos independientes, de: **b)** células mieloides $CD11b^{pos}$ de bazo; **c)** células mieloides monocíticas $CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high}$ de bazo y **d)** células mieloides granulocíticas $CD11b^{pos} Ly6G^{pos} Ly6C^{low}$ de bazo. Se llevaron a cabo análisis estadísticos *one way anova*. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al número de células obtenidas de los ratones NI; excepto en (b), dónde a pesar de que ningún día fue significativamente diferente al NI, el test determinó que el número de células variaba de forma significativa a lo largo del tiempo. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Resumen de las poblaciones analizadas

En resumen, todas las poblaciones celulares analizadas disminuyeron a lo largo de la fase aguda de la infección por *T. cruzi* en médula ósea, excepto las células mieloides monocíticas que aumentaron llegando a su máximo el día 13 post-infección. Las poblaciones celulares cuya disminución contribuyó más de forma neta a la reducción de la celularidad global de médula ósea fueron las células mieloides granulocíticas y los precursores de eritrocitos. Por el contrario, en bazo todas las células analizadas aumentaron en número durante la infección. Las poblaciones que contribuyeron en mayor medida al incremento de la celularidad de bazo fueron los precursores de eritrocitos y los eritrocitos maduros. Esto sugiere que la esplenomegalia que se observa durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* se debe, en gran medida, a este incremento en la eritropoyesis. Al final de la fase aguda todas las poblaciones volvieron a sus niveles normales en los ratones supervivientes (Figura 7).

Muchas células no fueron identificadas. Estas células podrían ser precursores de células dendríticas, precursores de células NK, precursores de megacariocitos, células dendríticas, células NK y megacariocitos maduros, células T recirculantes y células estromales (células grasas, endoteliales, fibroblastos, etc.).

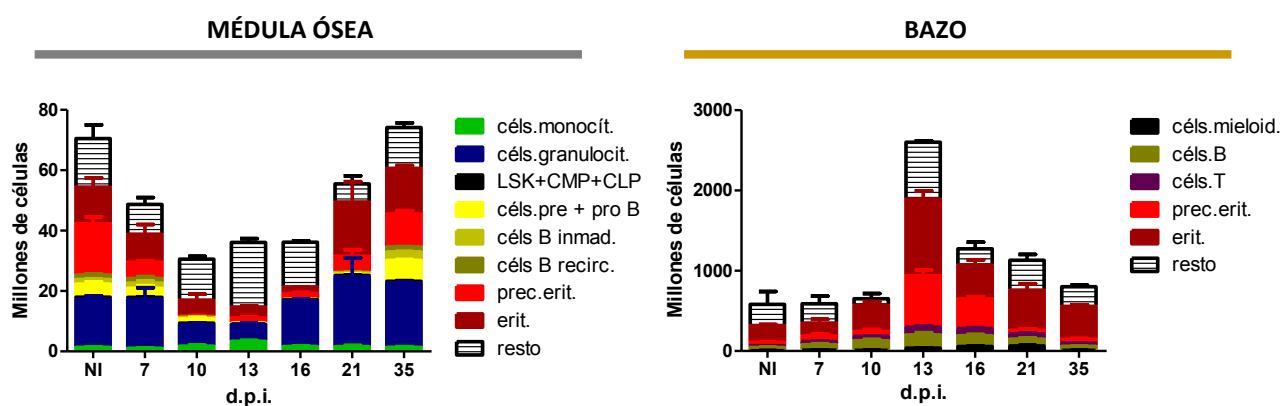


Figura 7. Resumen de las poblaciones analizadas. Se representa la aportación de cada población analizada al número total de células de médula ósea y bazo, en los diferentes días post-infección.

ALTERACIONES EN LA HEMATOPOYESIS DURANTE LA INFECCIÓN POR *T. CRUZI*: TIMO

Durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* el timo sufre una involución que ha sido asociada a la desaparición de los timocitos DP (Morrot et al., 2012).

Pudimos observar un incremento significativo de los timocitos totales al inicio de la infección, previo a la reducción del número total de células (Figura 8 a) y a la desaparición de los timocitos DP (Figura 8 b), ya descritos en la infección por *T. cruzi* (de Meis et al., 2009).

Dos son las principales hipótesis que se han planteado para explicar la desaparición de los timocitos DP y la involución tímica durante la infección por *T. cruzi*. Por un lado, se ha descrito la salida prematura de timocitos DP inmaduros del timo (Mendes-da-Cruz et al., 2006), y por otro, la apoptosis exacerbada anormal de los mismos (Perez et al., 2007). Nosotros, a raíz de las alteraciones observadas en las poblaciones de progenitores de linfocitos en médula ósea, planteamos una tercera hipótesis en la cual proponemos que la causa de la desaparición de los timocitos DP, durante la infección por *T. cruzi*, puede deberse a alteraciones en poblaciones de precursores T, previos a los timocitos DP.

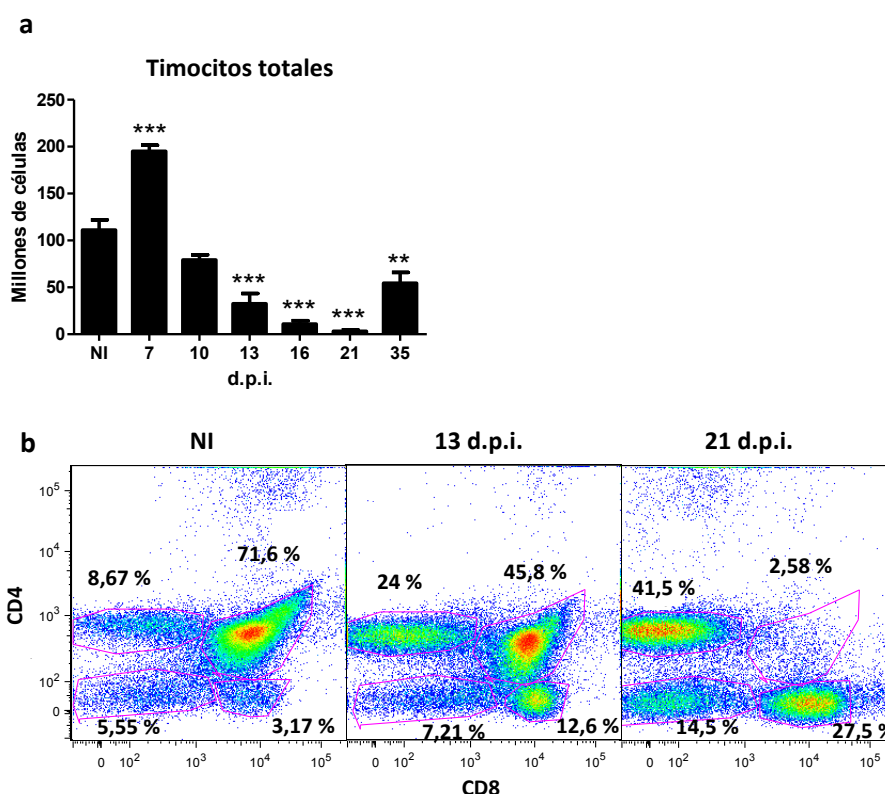


Figura 8. Atrofia de timo. Se extrajeron los timos de ratones BALB/c los días post-infección indicados y se analizaron las diferentes poblaciones por citometría de flujo, como se explica en materiales y métodos. **a)** Medias \pm SEM del número total de células por ratón ($n=3$), de un experimento representativo de, al menos, 6 experimentos independientes. Se llevó a cabo el test estadístico *one way anova*. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al número de células de los ratones NI. ** $p<0,01$ *** $p<0,001$. **b)** Ejemplo representativo de los porcentajes de timocitos DP en timo, durante la infección por *T. cruzi*.

Células T CD4 CD8 DP en órganos periféricos

Para comprobar si en nuestro modelo de infección por *T. cruzi* está ocurriendo una salida anormal de los timocitos DP a los órganos linfoides secundarios analizamos, por citometría de flujo, la presencia de estas células en ganglio y bazo a lo largo de la fase aguda de la infección.

Sin embargo, no observamos ningún incremento de células T DP en ganglio ni en bazo con la infección, a diferencia de lo que se describió en (Cotta-de-Almeida et al., 2003) (Figura 9). Es más, la proporción de células T DP disminuyó en la misma medida que lo hicieron las células CD4 y CD8 SP en bazo y las células CD4 SP en ganglios, debido al incremento de otras poblaciones celulares. Por lo tanto, al menos en nuestro modelo de infección de hembras BALB/c con la cepa Y de *T. cruzi* (en el trabajo citado utilizaban machos BALB/c con la cepa *Colombian*), parece que este fenómeno no está teniendo lugar y, por ende, no puede ser la causa de la desaparición de los timocitos DP del timo.

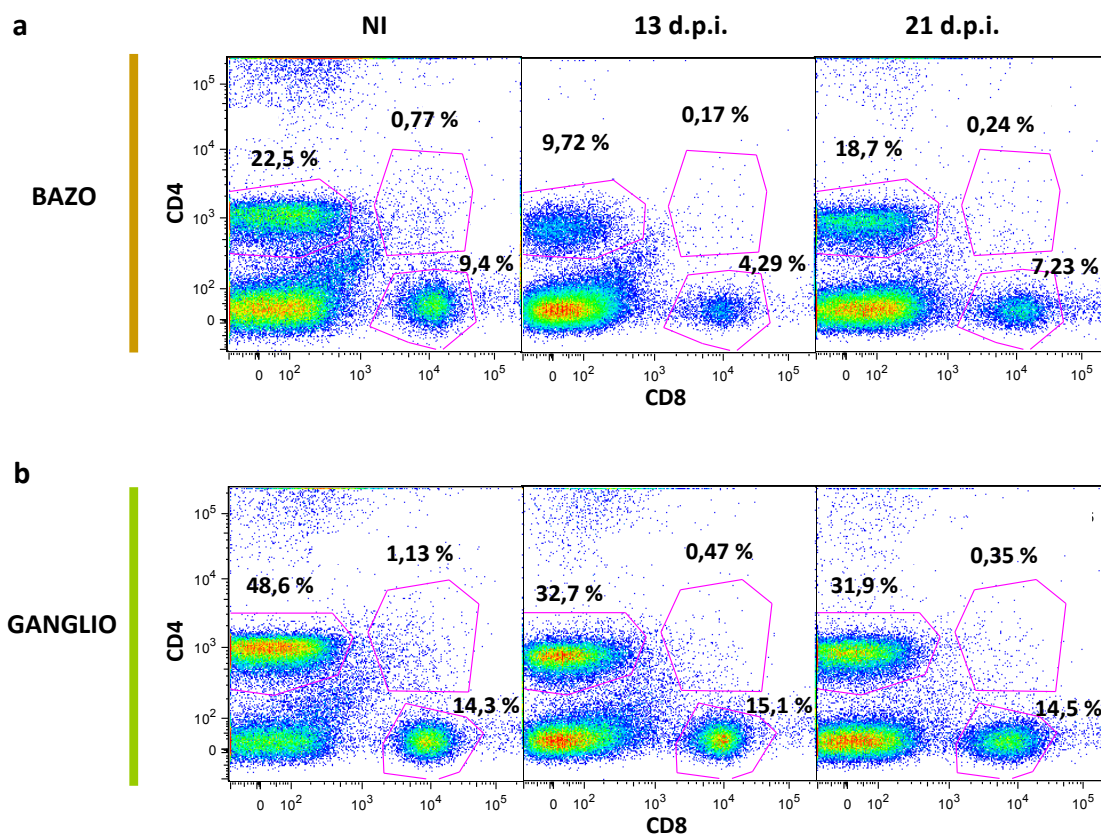


Figura 9. Salida de timocitos DP del timo. Se extrajeron los ganglios subcutáneos inguinales y los bazos de ratones NI e infectados a 21 d.p.i. (n=3) y se analizaron las poblaciones celulares por citometría de flujo, como se explica en materiales y métodos. Se muestran un ejemplo representativo de los porcentajes de células CD4^{pos}CD8^{pos} obtenidos de: **a)** bazo y **b)** ganglio, a lo largo de la infección por *T. cruzi*, de un experimento representativo, de 3 experimentos independientes.

Apoptosis en timo

Con el fin de determinar si en nuestro modelo está ocurriendo un incremento de la apoptosis de los timocitos DP, mediado por la acción de los glucocorticoides, decidimos analizar los niveles de corticosterona en plasma y la apoptosis en timo a lo largo de la fase aguda de la infección por *T. cruzi*.

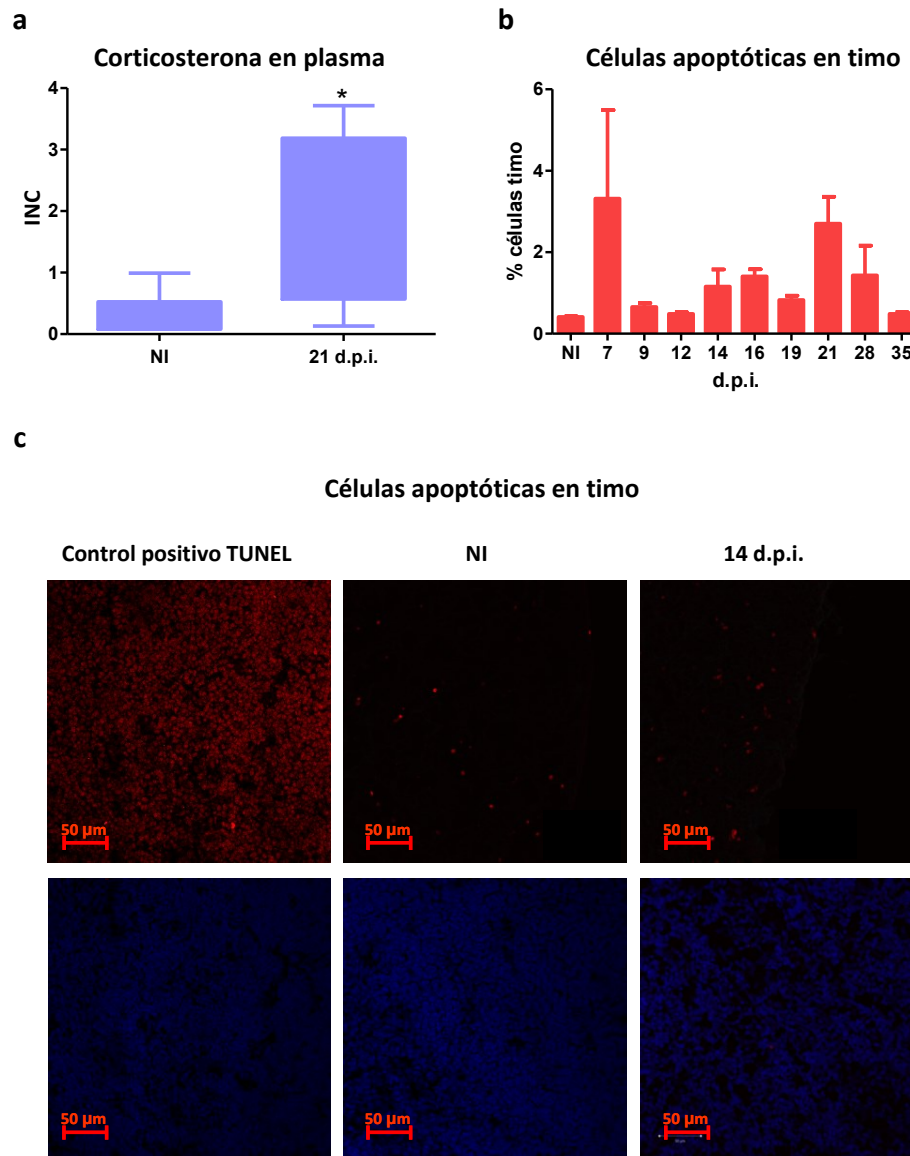


Figura 10. Glucocorticoides en plasma y apoptosis en timo. Se extrajeron los plasmas de ratones BALB/c a los diferentes d.p.i. indicados y fueron analizados en la empresa Metabolon, mediante cromatografía gaseosa y espectrofotometría de masas (GC/MS) y/o cromatografía líquida y espectrofotometría de masas (LC/MS), para determinar los niveles de distintos metabolitos, entre ellos la corticosterona. Por otro lado se extrajeron los timos en los días post-infección indicados y se procesaron para identificar la presencia de células apoptóticas mediante la técnica TUNEL por citometría de flujo y por inmunofluorescencia, como se explica en materiales y métodos. **a)** Corticosterona en plasma. Se muestran las medias \pm SEM ($n=6$) de los datos escalados INC, calculados como se describe en materiales y métodos. Se llevó a cabo el análisis estadístico *T Student* $*p<0,1$. **b)** Se muestran las medias \pm SEM del número total de células TUNEL^{pos} a diferentes días post-infección ($n=3$), de un experimento representativo de dos experimentos independientes. Se llevó a cabo el test estadístico *one way anova* que no dio significativo en ningún punto. **c)** Imagen representativa de células TUNEL^{pos} de timo de ratones NI y 14 d.p.i.

RESULTADOS

Observamos un incremento significativo de los niveles de corticosterona en plasma con la infección (Figura 10 a), sin embargo, este no fue acompañado por un aumento significativo de la apoptosis en timo ninguno de los días analizados (Figura 10 b), a diferencia de lo que se describió en (Perez et al., 2007). En la (figura 10 c) se muestra un ejemplo de la apoptosis en timo. No se apreciaron muchas diferencias entre los timos procedentes de ratones NI y los procedentes de ratones infectados a 14 d.p.i., día en el que el timo se encontraba en pleno proceso de involución y deberían haberse observado altas tasas de apoptosis, en el caso de que, efectivamente, la apoptosis de los timocitos DP fuese la causa de la atrofia de este órgano.

Precursores de células T previos a los timocitos dobles positivos (DP)

Por último analizamos como variaban a lo largo de la infección los precursores de timocitos previos a los timocitos DP.

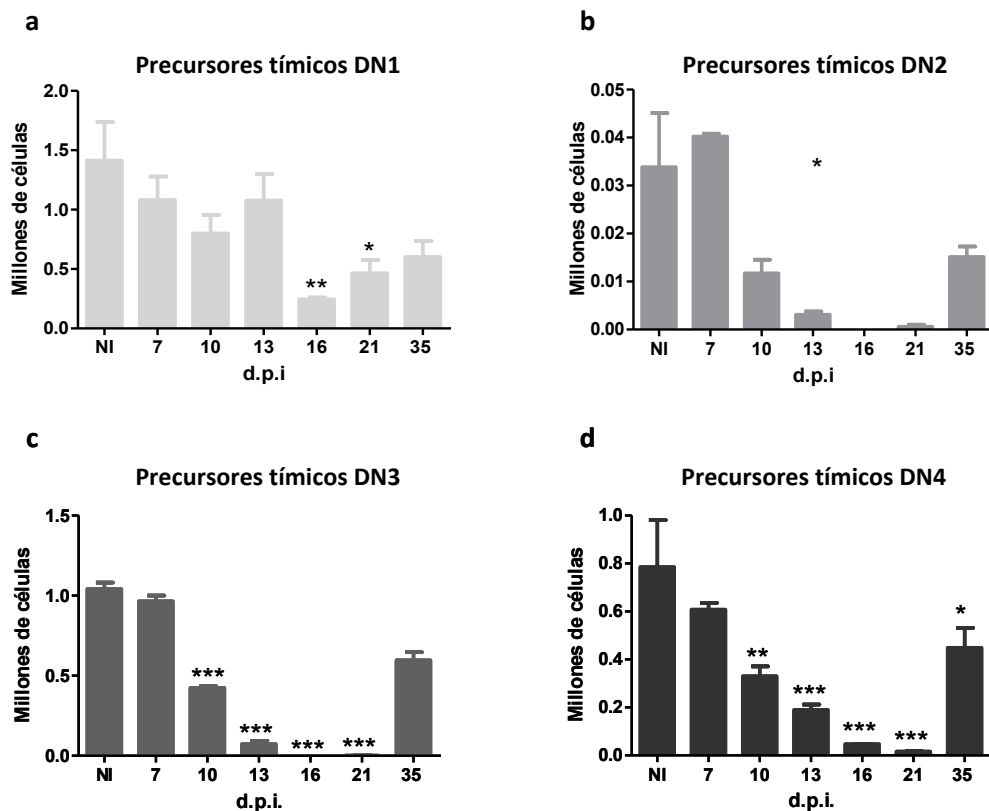


Figura 11. Timocitos DN. Se extrajeron los timos de ratones BALB/c los días post-infección indicados y se procesaron para citometría de flujo, como se explica en materiales y métodos. A continuación se muestran las medias \pm SEM (n=3) del número total de células de: **a)** DN1: Lin^{neg} CD44^{pos} CD25^{neg}; **b)** DN2: Lin^{neg} CD44^{pos} CD25^{pos}; **c)** DN3: Lin^{neg} CD44^{neg} CD25^{pos} y **d)** DN4: Lin^{neg} CD44^{neg} CD25^{neg}, de un experimento representativo de dos experimentos independientes. Se llevó a cabo el test estadístico *one way anova*. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al número de células de los ratones NI. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

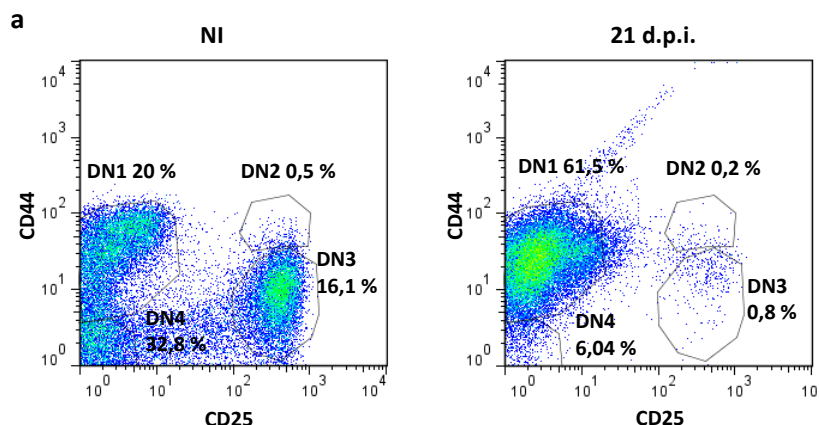


Figura 12. Timocitos DN. Ejemplo representativo de los porcentajes de timocitos DN, en las diferentes etapas de diferenciación, en ratones NI e infectados a 21 d.p.i.

Observamos que todas las poblaciones de timocitos DN (desde la DN1, que incluye los precursores T procedentes de médula ósea) disminuyeron durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, para comenzar a recuperarse al final de esta, en los ratones supervivientes (Figura 11 b, c, d y e). Esto podría deberse a la falta de precursores T de médula ósea mencionada anteriormente, sin embargo, también se detectó un bloqueo en la diferenciación de los timocitos DN entre los estadios DN1 y DN2. Éste se apreció tanto por la reducción del número total de timocitos DN2, DN3 y DN4, que ocurrió previamente a la disminución de los timocitos DN1 (lo cual implica que se debe a un proceso independiente), como por la disminución de la frecuencia de estas células dentro del total de timocitos DN (Figura 12).

Analizando las poblaciones en timo en función de la expresión de los marcadores CD4 y CD8 pudimos determinar que la disminución de los timocitos DN (Figura 13 a) ocurrió previamente a la disminución de los timocitos DP (Figura 13 b), por tanto, la primera podría ser la causa de la segunda. También los timocitos SP disminuyeron a partir del día 21 post-infección, muy probablemente, como consecuencia de la depleción de sus precursores (Figura 13 c y d).

Se observó un incremento del número de células el día 7 post- infección en los timocitos DP y en los timocitos SP. Esto sugiere, que la timopoyesis podría estar siendo favorecida al inicio de la infección, probablemente, a través de la inducción de la proliferación de los timocitos DP, pues este incremento de células no se observó en sus precursores DN.

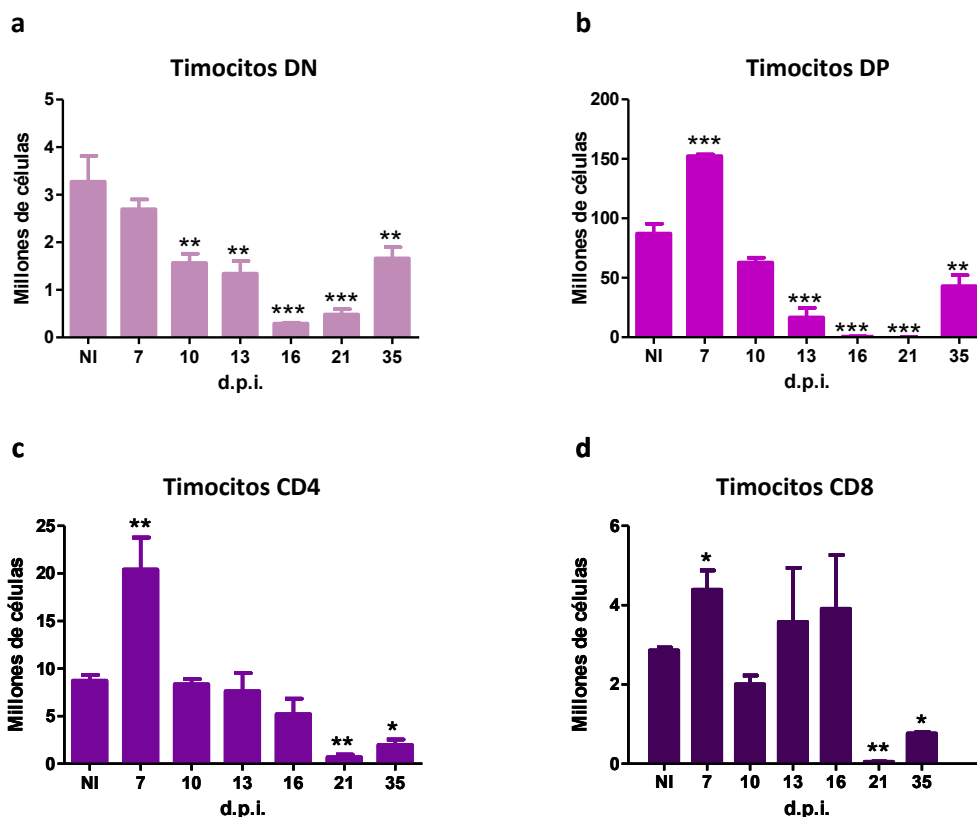


Figura 13. Timocitos totales. Se extrajeron los timos de ratones BALB/c los días post-infección indicados y se procesaron para citometría de flujo, como se explica en materiales y métodos. Se muestran las medias \pm SEM (n=3) del número total de células de: **a)** timocitos DN: DN1+DN2+DN3+DN4, **b)** timocitos DP: CD4^{pos} CD8^{pos}, **c)** timocitos CD4 SP: CD4^{pos} CD8^{neg} y **d)** timocitos CD8 SP: CD4^{neg} CD8^{pos}, de un experimento representativo de, al menos 6 experimentos independientes. Se llevó a cabo el test estadístico *one way anova*. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al número de células de los ratones NI. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

Efecto de la citoquina IL6 en las alteraciones tímicas durante la infección por *T. cruzi*

La citoquina IL6 se ha visto involucrada en algunos casos de atrofia del timo, como depleción tímica debida a la edad (Sempowski et al., 2000) o atrofia tímica fetal por tratamientos con LPS (Kuypers et al., 2013).

Con idea de analizar la posible implicación de esta citoquina en las alteraciones tímicas, causadas por la infección por *T. cruzi*, analizamos las diferentes poblaciones de timocitos en ratones genéticamente deficientes para IL6 (IL6 KO), durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*.

Este experimento se llevó a cabo en ratones de fondo genético C57BL/6, los cuales experimentaron alteraciones tímicas similares a las observadas en los ratones BALB/c.

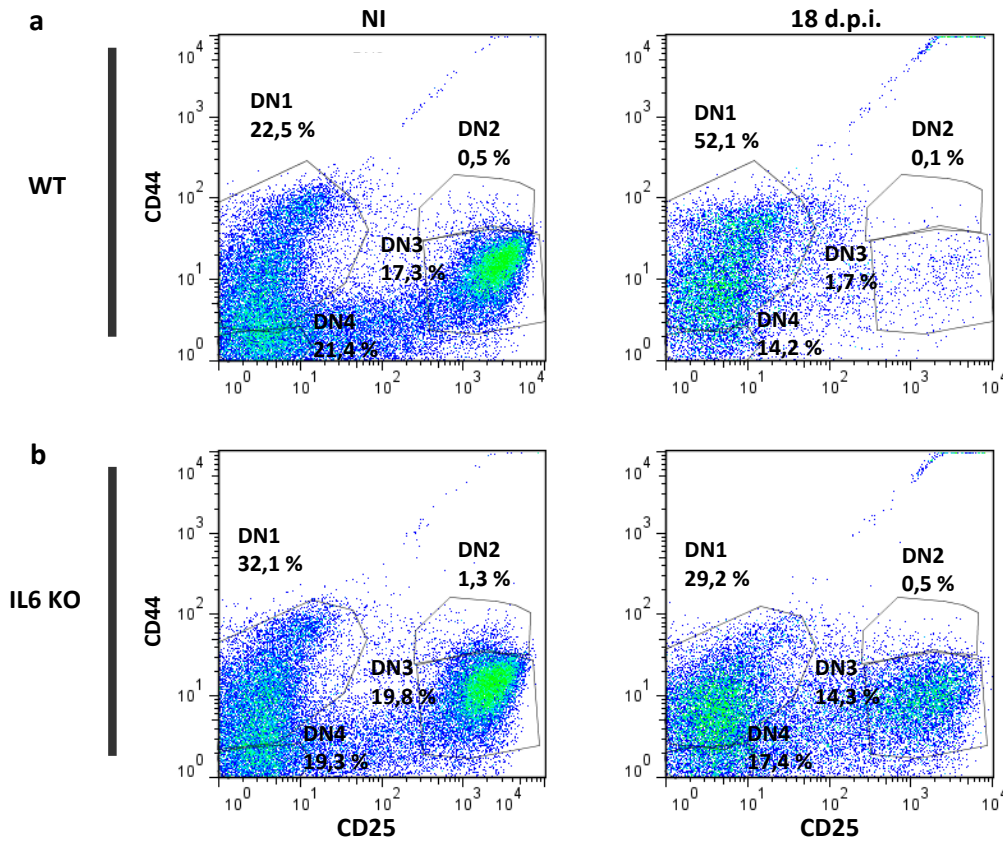


Figura 14. Precursores de células T en ratones IL6 KO. Se extrajeron los timos de ratones C57BL/6 WT y C57BL/6 KO para IL6 y se procesaron para citometría de flujo, como se explica en materiales y métodos. Se muestra un ejemplo representativo de los porcentajes de timocitos en cada estadio de diferenciación DN de: **a)** ratones C57BL/6 WT y **b)** ratones C57BL/6 IL6 KO.

En los ratones IL6 KO no se observó el bloqueo en el paso de los timocitos DN1 a timocitos DN2 en la misma medida que en los C57BL/6 WT (Figura 14), por lo que este proceso podría ser dependiente de la señalización mediada por esta citoquina.

Esto se vió reflejado en el hecho de que las frecuencias de las diferentes poblaciones DN no disminuyeron significativamente con la infección (Figura 15 a, c y d), excepto en el caso de DN2 (Figura 15 b).

Tampoco disminuyó significativamente el porcentaje de los timocitos DP en los ratones IL6 KO (Figura 15 e). Esto sugiere que la disminución en la proporción de los timocitos DP es dependiente de la reducción en la proporción de sus precursores previos.

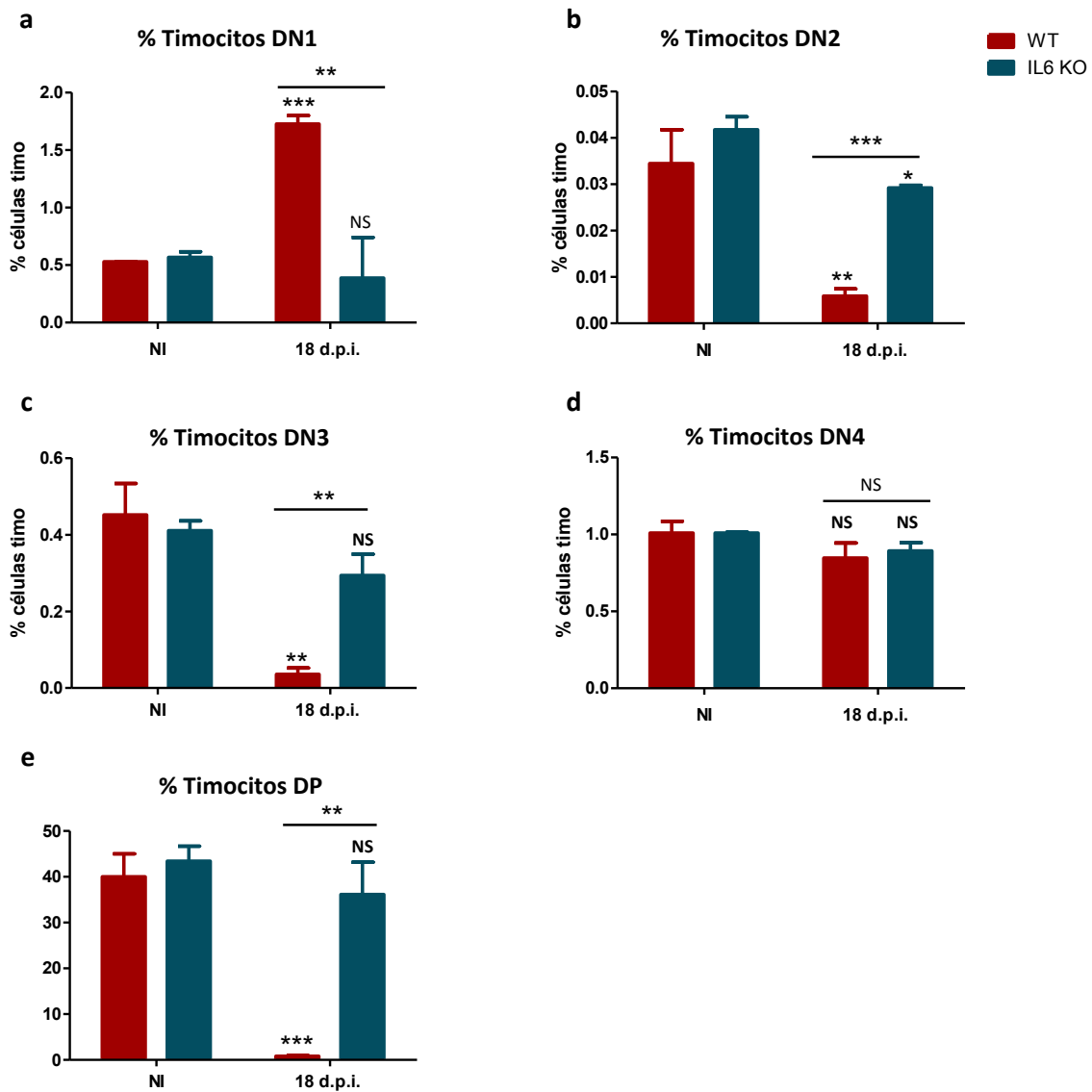


Figura 15. Precursores de células T en ratones IL6 KO. Se muestran las medias \pm SEM (n=4) de los porcentajes de timocitos: **a)** DN1: $\text{Lin}^{\text{neg}} \text{CD44}^{\text{pos}} \text{CD25}^{\text{neg}}$; **b)** DN2: $\text{Lin}^{\text{neg}} \text{CD44}^{\text{pos}} \text{CD25}^{\text{pos}}$; **c)** DN3: $\text{Lin}^{\text{neg}} \text{CD44}^{\text{neg}} \text{CD25}^{\text{pos}}$; **d)** DN4: $\text{Lin}^{\text{neg}} \text{CD44}^{\text{neg}} \text{CD25}^{\text{neg}}$ y **e)** timocitos DP $\text{CD4}^{\text{pos}} \text{CD8}^{\text{pos}}$. Se llevó a cabo el test estadístico *T de Student* comparando, por un lado, ratones WT vs IL6 KO 18 d.p.i. (asteriscos sobre barra negra) y, por el otro NI vs 18dpi. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Sin embargo, sí se observó una reducción del número total de células de todas las poblaciones analizadas en los ratones IL6 KO (Figura 16). En el caso de los timocitos DN1 la disminución del número de células en los ratones IL6 KO ocurrió en la misma medida que en los ratones WT, lo cual implica que es un proceso independiente de esta citoquina (Figura 16 a). Es probable que esta disminución de timocitos DN1 se deba a una menor entrada de progenitores T procedentes de médula ósea, debido a la reducción del número de CLPs que hemos descrito anteriormente.

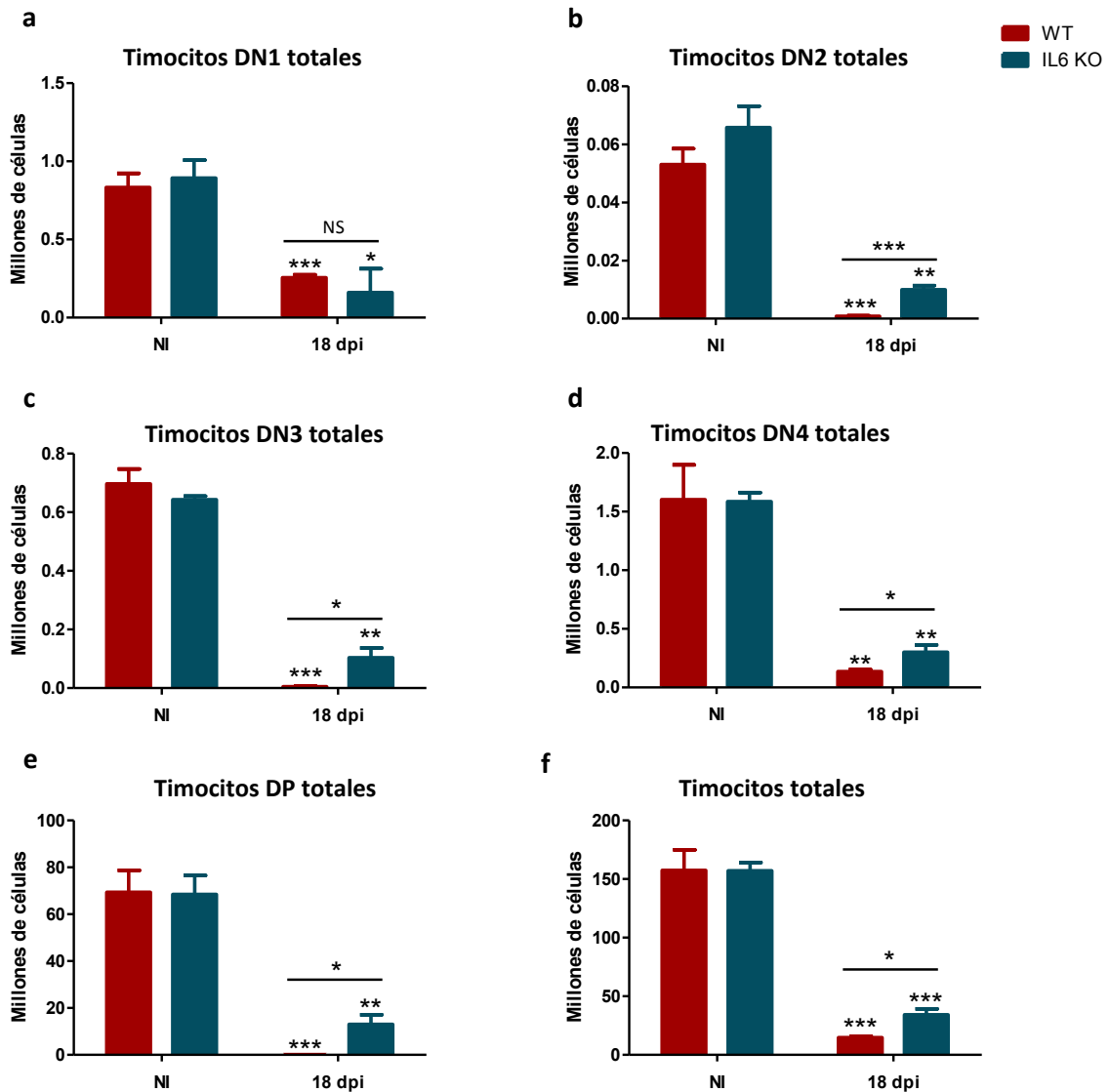


Figura 16. Número de timocitos totales en ratones IL6 KO. Se extrajeron los timos en los días post-infección indicados de ratones C57BL/6 WT y C57BL/6 IL6 KO y se procesaron para citometría de flujo, como se muestra en materiales y métodos. Se muestran las medias \pm SEM (n=4) del número total de timocitos: (a) DN1: Lin^{neg} CD44^{pos} CD25^{neg}; (b) DN2: Lin^{neg} CD44^{pos} CD25^{pos}; (c) DN3: Lin^{neg} CD44^{neg} CD25^{pos}; (d) DN4: Lin^{neg} CD44^{neg} CD25^{neg}; (e) timocitos DP CD4^{pos} CD8^{pos} y (f) número total de células del timo. Se llevó a cabo el test estadístico *T student*, por un lado, comparando ratones WT vs IL6 KO 18 d.p.i. y, por otro, NI vs 18 d.p.i. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

Del resto de las poblaciones, aunque se observó mayor número de células en los ratones infectados IL6 KO que en los ratones infectados WT, este fue menor que el de los ratones NI, lo cual confirma que, aunque el bloqueo en la diferenciación de los timocitos DN influye en la reducción de la celularidad global del timo, no es el único proceso que está operando (Figura 16 b, c, d y e).

CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS DURANTE LA INFECCIÓN POR *T. cruzi*

Como ya hemos comentado previamente, hemos descrito la presencia de MDSCs monocíticas CD11b^{pos} Ly6G^{neg} en corazón durante la infección por *T. cruzi* (Cuervo et al., 2011).

MDSCs en corazón

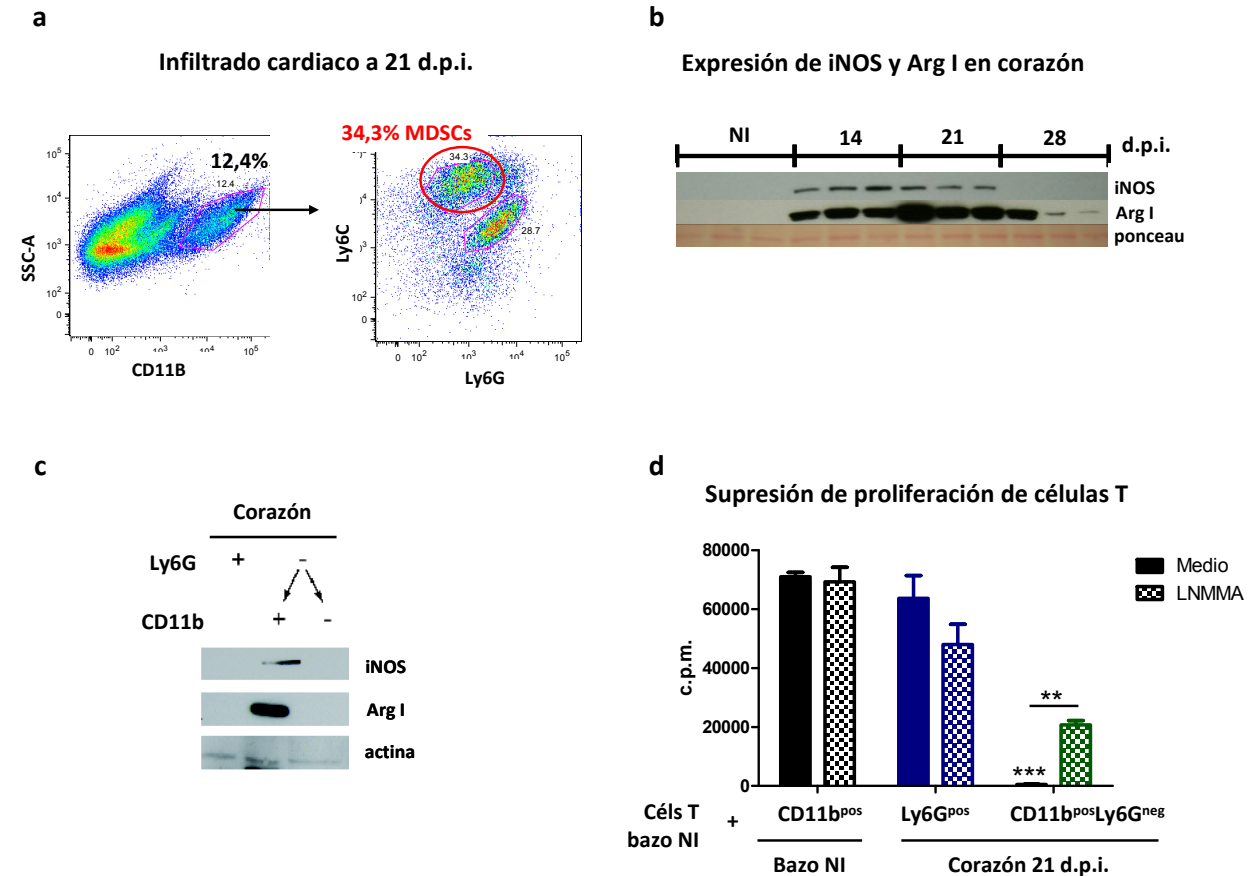


Figura 17. MDSCs en corazón. Se extrajeron los corazones de ratones BALB/c a 21 d.p.i. y se procesaron para extracción de proteínas, purificación del infiltrado inflamatorio, análisis por citometría de flujo y purificación de las diferentes poblaciones celulares mediante separación magnética, como se muestra en materiales y métodos. **a)** Análisis de la expresión de las proteínas iNOS y Arg I en corazón mediante *western blot* (n=3). **b)** Ejemplo representativo de análisis de las poblaciones CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high} y CD11b^{pos} Ly6G^{pos} Ly6C^{low} del infiltrado inflamatorio de corazón. **c)** Análisis de la expresión de iNOS y Arg I en las diferentes poblaciones purificadas del infiltrado inflamatorio de corazón. **d)** Ensayo de supresión de la proliferación de células T. Se analizó la proliferación de las células T NI, en respuesta a anti CD3/anti CD28, en medio de cultivo normal y en presencia del inhibidor de la iNOS LNMMA, en co-cultivo con: CD11b^{pos} de bazoos procedentes de ratones NI, y células Ly6G^{pos} y Ly6G^{neg}CD11b^{pos} procedentes del infiltrado inflamatorio de un *pool* de corazones infectados a 21 d.p.i. Se muestran las medias \pm SEM obtenidas de triplicados de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Se llevaron a cabo análisis estadísticos *T de Student* comparando los proliferativos de las células T co-cultivadas con las células purificadas de corazones infectados, con los proliferativos de las células T co-cultivadas con las CD11b^{pos} de ratones NI, que se utilizaron como control (asteriscos); y los proliferativos en medio normal con los proliferativos en presencia de LNMMA (asteriscos sobre barra).

p<0,01 *p<0,001

En la (Figura 17) se muestra un resumen de los resultados obtenidos en MDSCs purificadas de corazón durante la infección por *T. cruzi*, algunos de ellos publicados en (Cuervo et al., 2011). Pudimos observar la presencia de células mieloides monocíticas CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high} y de células mieloides granulocíticas CD11b^{pos} Ly6G^{pos} Ly6C^{low} en el infiltrado inflamatorio purificado de

un *pool* de corazones procedentes de ratones a 21 d.p.i. (Figura 17 a). También observamos aumento de la expresión de iNOS y Arg I en tejido cardíaco durante la infección (Figuras 17 b). Purificamos las poblaciones Ly6G^{pos} y CD11b^{pos} Ly6G^{neg} y vimos que las células responsables de la expresión de iNOS y Arg I en corazón durante la infección por *T. cruzi* eran las células CD11b^{pos} Ly6G^{neg} y no las Ly6G^{pos}, ni las CD11b^{neg} (Figura 17 c). Por último, ensayamos la capacidad de suprimir la proliferación de células T de las distintas poblaciones purificadas y observamos que estas mismas células CD11b^{pos} Ly6G^{neg}, pero no las células Ly6G^{pos}, fueron capaces de suprimir la proliferación de las células T. Esta supresión fue dependiente, al menos en parte, de la producción de NO, ya que la proliferación de las células T se recuperó parcialmente en presencia del inhibidor de la iNOS L-NMMA (Figura 17 d). Concluimos, por lo tanto, que MDSCs monocíticas infiltran el corazón durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*.

Anteriormente mostramos que células granulocíticas CD11b^{pos} Ly6G^{pos} Ly6C^{low} aumentaban en el bazo y células monocíticas CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high}, aumentaban en la médula ósea y en el bazo, durante la infección por *T. cruzi*.

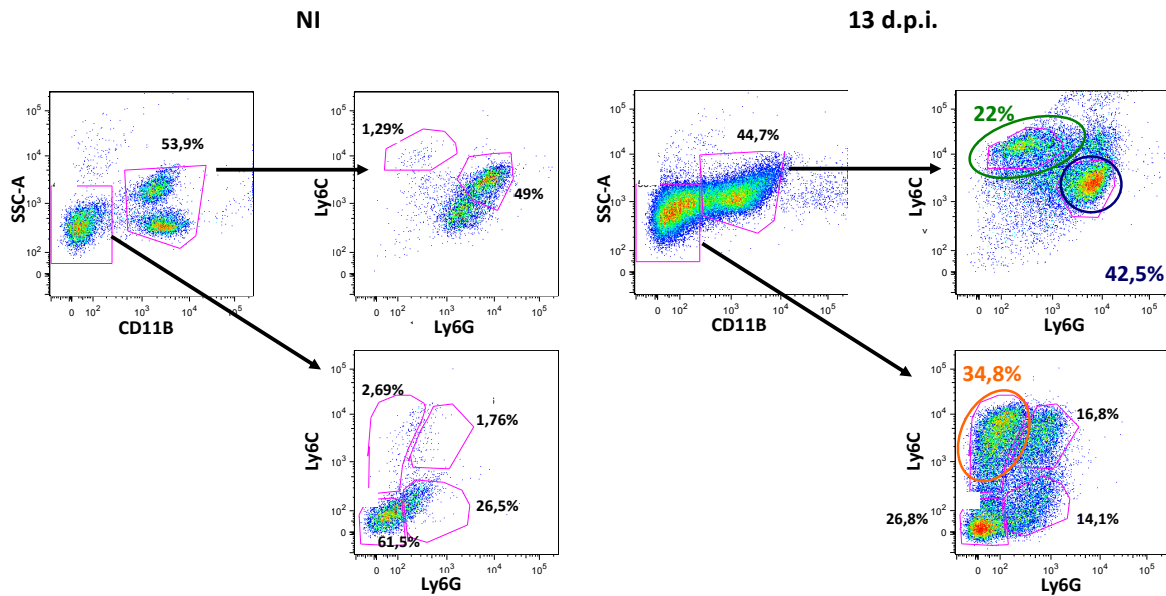
Nos planteamos determinar si estas células son MDSCs y analizamos su presencia en otros órganos del sistema inmune, a lo largo de la fase aguda de la infección por *T. cruzi*.

Para ello, estudiamos la expresión de CD11b, Ly6G, Ly6C, como marcadores fenotípicos de MDSCs, analizamos la expresión de iNOS y Arg I, como marcadores de posible actividad supresora de MDSCs y, por último, purificamos las potenciales MDSCs y ensayamos su capacidad para suprimir la proliferación de las células T.

MDSCs en médula ósea

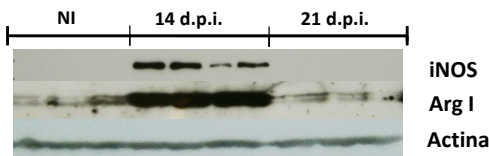
A día 13 post-infección observamos, en células CD11b^{pos}, las dos posibles poblaciones de MDSCs que anteriormente nombramos como células mieloides monocíticas y células mieloides granulocíticas. Sorprendentemente, también observamos la presencia de células CD11b^{neg} que fueron positivas para los marcadores Ly6G y Ly6C. Estas células podrían ser MDSCs que perdieron la expresión de CD11b o que no llegaron a expresarlo por ser más inmaduras aún que las CD11b^{pos} (Figura 18 a). Se observó la expresión de iNOS y Arg I en médulas óseas de ratones a 13 d.p.i., coincidente con el máximo número de células mieloides monocíticas CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high} (posibles MDSCs monocíticas) en este tejido (Figura 18 b).

a



b

Expresión de iNOS y Arg I en médula ósea



c

Supresión de proliferación de esplenocitos

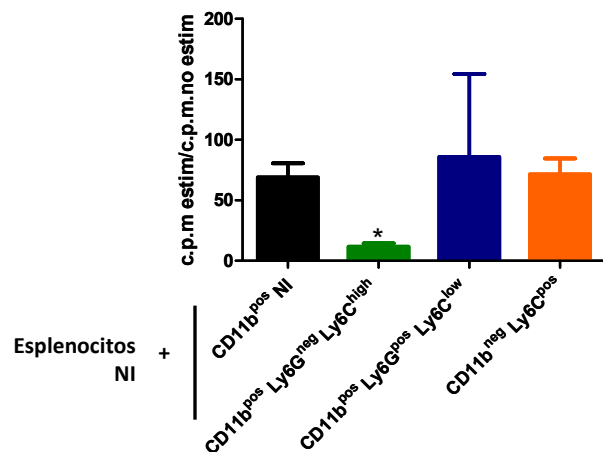


Figura 18. MDSCs en médula ósea. Se extrajeron las médulas óseas de ratones BALB/c los días post- infección indicados y se procesaron para extracción de proteínas, citometría de flujo y *sorting*, como se muestra en materiales y métodos. **a)** Ejemplo representativo del análisis de las poblaciones CD11b^{pos} y CD11b^{neg}, en función de la expresión de los marcadores Ly6G y Ly6C, en las médulas óseas procedentes de ratones NI y ratones 13 d.p.i. **b)** Análisis de expresión de las proteínas iNOS y Arg I, por *western blot*, en médula ósea (n=4). **(c)** Ensayos de supresión de la proliferación de esplenocitos. De las médulas óseas de ratones NI se purificó la población CD11b^{pos} y de las médulas óseas de ratones 13 d.p.i. se purificaron las poblaciones CD11b^{pos}Ly6G^{neg} Ly6C^{high}, CD11b^{pos}Ly6G^{high}Ly6C^{low} y CD11b^{neg}Ly6C^{pos}, como se muestra en materiales y métodos. Por otro lado se extrajeron esplenocitos totales de ratones NI. Los esplenocitos se pusieron en co-cultivo en relación 1:1 con cada una de las poblaciones purificadas y se determinó la tasa de proliferación de los esplenocitos estimulados con Con A y co-cultivados con cada población, respecto a esplenocitos sin estimular. En la figura se muestran las medias +/- SEM obtenidas de los triplicados de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Se llevaron a cabo análisis estadísticos *T de Student* comparando los proliferativos de los esplenocitos co-cultivados con las células purificadas de ratones infectados, con los proliferativos de los esplenocitos co-cultivados con las CD11b^{pos} purificadas de ratones NI, que se utilizaron como control. *p<0,05.

Por último, purificamos las dos poblaciones CD11b^{pos} (la monocítica CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high} y la granulocítica CD11b^{pos} Ly6G^{pos} Ly6C^{low}) y la población CD11b^{neg} Ly6C^{pos}, que fue la que más aumentó (de las CD11b^{neg}) en los días analizados, y ensayamos la capacidad supresora de cada una. Las células mieloides monocíticas CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high} purificadas de un *pool* de médulas óseas de ratones infectados a 13 d.p.i. fueron capaces de suprimir la proliferación de los esplenocitos en respuesta a Con A (Figura 18 c), por lo que presentan características de MDSCs. Por el contrario, ni las células mieloides granulocíticas CD11b^{pos} Ly6G^{high} Ly6C^{low}, ni las células CD11b^{neg} Ly6C^{pos}, fueron capaces de suprimir la proliferación de los esplenocitos en las condiciones ensayadas.

Dada su capacidad de producir NO y de reducir los niveles de L-arg, las MDSCs podrían ser en parte responsables de las alteraciones que se dan en la hematopoyesis durante la infección por *T. cruzi*. Así se ha descrito previamente en (Maciejewski et al., 1995), donde se observó la supresión *in vitro* de la hematopoyesis en humanos mediada por NO; y en (Mabbott and Sternberg, 1995) donde se propuso que el NO podía estar implicado en la supresión *in vivo* de la eritropoyesis durante la infección por *T. brucei*. Por otro lado, en (Zuniga et al., 2005) se relacionó la presencia de células mieloides CD11b^{pos} con la supresión de la linfopoyesis B en la infección por *T. cruzi*.

Para determinar la posible implicación de las MDSCs de médula ósea en la supresión de la hematopoyesis decidimos ensayar su capacidad para suprimir la proliferación de las células de médula ósea en respuesta a Con A. Este se considera fundamentalmente un estímulo de célula T, sin embargo, es una lectina que se une a diversas estructuras de carbohidratos y podría también estimular la proliferación de otros tipos celulares de forma inespecífica (Petryniak et al., 1986).

Las MDSCs monocíticas procedentes de las médulas óseas de ratones infectados a 13 d.p.i. fueron capaces de suprimir la proliferación de las células obtenidas de las médulas óseas de ratones NI (Figura 19). Esto sugiere que las MDSCs podrían ser responsables, al menos en parte, de algunas de las alteraciones observadas en la hematopoyesis de médula ósea, durante la infección por *T. cruzi*. Por su parte, las células mieloides granulocíticas de ratones infectados no fueron capaces de suprimir la proliferación de las células de la médula ósea.

Supresión de proliferación de células de médula ósea

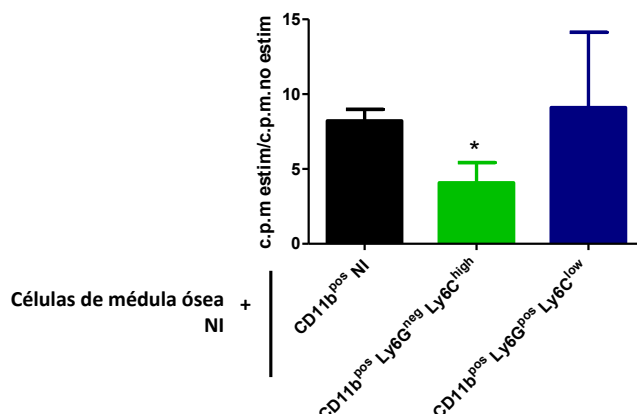


Figura 19. Ensayo de supresión de la proliferación de células de médula ósea. Se extrajeron las médulas óseas de ratones BALB/c NI e infectados a 13 d.p.i. De las médulas óseas de ratones NI se purificó la población CD11b^{pos} y de las médulas óseas de ratones 13 d.p.i. las poblaciones CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high}, CD11b^{pos} Ly6G^{high} Ly6C^{low} y CD11b^{neg} Ly6C^{pos}, como se muestra en materiales y métodos. Por otro lado se extrajeron las células de médula ósea totales de ratones BALB/c NI. Se pusieron en co-cultivo en relación 1:1 las células de la médula ósea de ratones NI con cada una de las poblaciones purificadas. Se analizó la tasa de proliferación de las células totales de médula ósea estimuladas con Con A y co-cultivadas con cada población, respecto a las células totales de médula ósea sin estimular. Se muestran las medias +/- SEM obtenidas de triplicados de un experimento representativo de tres. Se llevaron a cabo análisis estadísticos *T de Student* comparando los proliferativos de las células de médula ósea co-cultivadas con las células purificadas de ratones infectados, con los proliferativos de las células de médula ósea co-cultivadas con las CD11b^{pos} purificadas de ratones NI, que se utilizaron como control. *p<0,05.

MDSCs en bazo

En nuestro laboratorio y otros se ha descrito la presencia de MDSCs CD11b^{pos} Gr1^{pos} en bazo que causan supresión de la proliferación de células T en este órgano durante la infección por *T. cruzi* (Arocena et al., 2013; Goni et al., 2002), sin embargo, se desconoce si son MDSCs monocíticas Ly6G^{neg} Ly6C^{high} o MDSCs granulocíticas Ly6G^{pos} Ly6C^{low}.

También en bazo pudimos observar las mismas poblaciones que veíamos en corazón y en médula ósea y la inducción de la expresión de iNOS y Arg I, con la infección (Figura 20 a y b). Y de igual forma, las células mieloides monocíticas CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high} procedentes de los bazos de ratones infectados a 13 d.p.i., fueron capaces de suprimir la proliferación de los esplenocitos control, confirmando sus características de MDSCs. Tampoco en este órgano las células CD11b^{pos} Ly6G^{pos} Ly6C^{low} y las células CD11b^{neg} Ly6C^{high}, procedentes de ratones infectados a 13 d.p.i., fueron capaces de suprimir la proliferación de los esplenocitos control (Figura 20 c). Por lo tanto, las células CD11b^{pos} Gr1^{pos} que causan supresión de la proliferación de células T en bazo durante la infección por *T. cruzi* son MDSCs monocíticas CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high}, como las que observamos en médula ósea y en corazón.

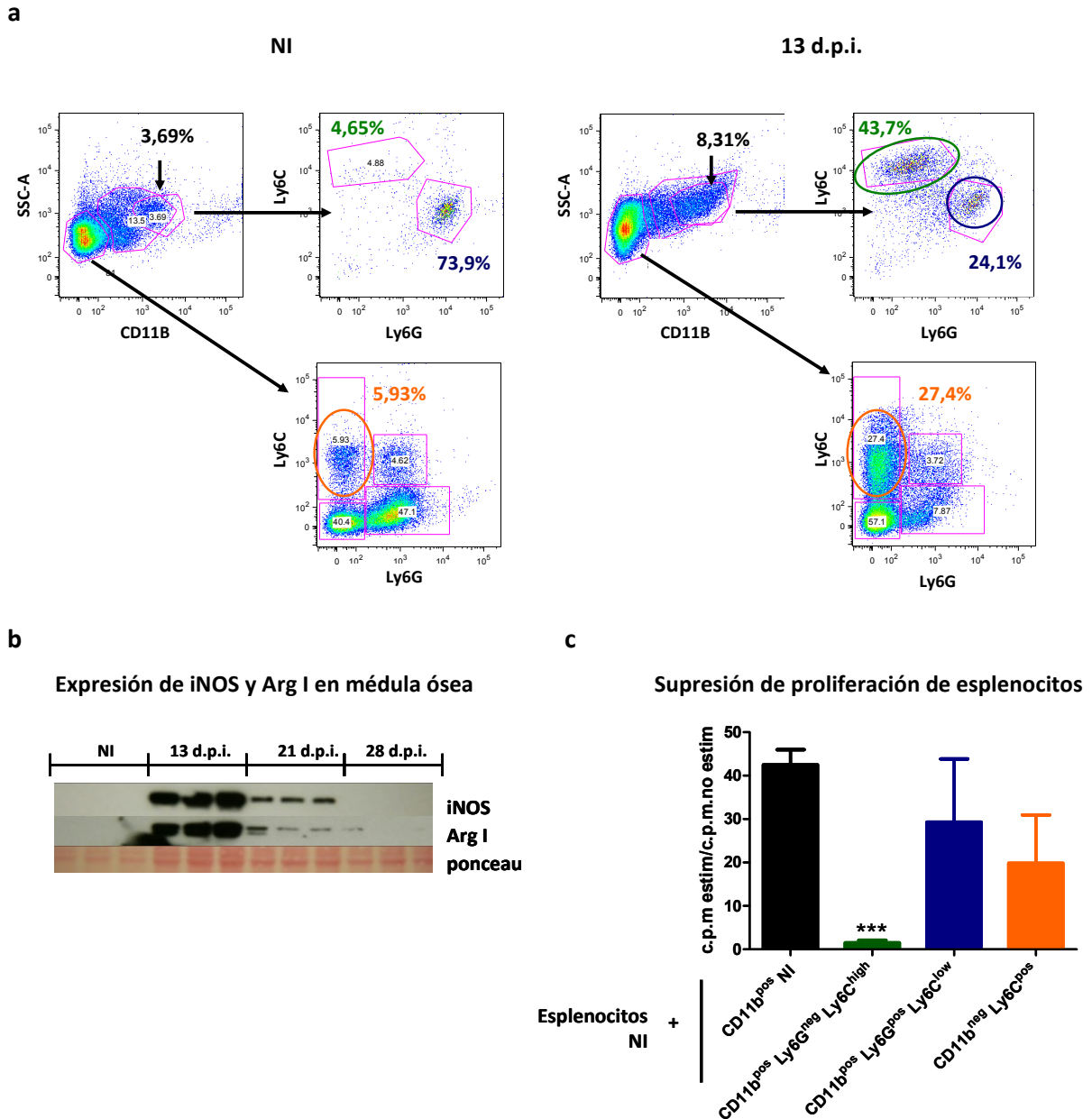


Figura 20. MDSCs en Bazo. Se extrajeron los bazo de ratones BALB/c los días post- infección indicados y se procesaron para extracción de proteínas, citometría de flujo y *sorting*, como se explica en materiales y métodos. **a)** Ejemplo representativo de los análisis de las poblaciones CD11b^{pos} y CD11b^{neg}, en función de la expresión de los marcadores Ly6G y Ly6C. **b)** Análisis de la expresión de las proteínas iNOS y Arg I, por *western blot*, en bazo (n=3). **c)** Ensayo de supresión de la proliferación de esplenocitos. De los bazo de ratones NI se purificó la población CD11b^{pos} y de los bazo de ratones 13 d.p.i. se purificaron las poblaciones CD11b^{pos}Ly6G^{neg}Ly6C^{high}, CD11b^{pos}Ly6G^{pos}Ly6C^{low} y CD11b^{neg}Ly6C^{pos}, como se muestra en materiales y métodos. Por otro lado se extrajeron los esplenocitos de ratones NI. Se pusieron en co-cultivo en relación 1:1 los esplenocitos, con cada una de las poblaciones purificadas, y se determinó la tasa de proliferación de los esplenocitos estimulados, co-cultivados con cada población, en relación a la proliferación de los esplenocitos no estimulados. Se muestran las medias \pm SEM obtenidas de triplicados de un experimento representativo de tres experimentos independientes. Se llevaron a cabo análisis estadísticos *T de Student* comparando los proliferativos de los esplenocitos co-cultivados con las células purificadas de ratones infectados, con los de los esplenocitos co-cultivados con las células CD11b^{pos} purificadas de ratones NI, que se utilizaron como control. ***p<0,001.

MDSCs en ganglio

En los ganglios subcutáneos sólo a 21 d.p.i. se distinguieron las poblaciones que veíamos en médula ósea y en bazo, especialmente la $CD11b^{pos}Ly6G^{pos}Ly6C^{low}$ y la $CD11b^{neg}$, que han resultado no ser supresoras en los otros tejidos estudiados (Figura 21 a). Tampoco detectamos la expresión de iNOS y Arg I (Figura 21 b) y como no hay evidencias de supresión en estos órganos, dónde ocurre una importante expansión de las células T durante la infección por *T. cruzi* (de Meis et al., 2009), concluimos que no hay presencia de MDSCs en los ganglios subcutáneos durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*.

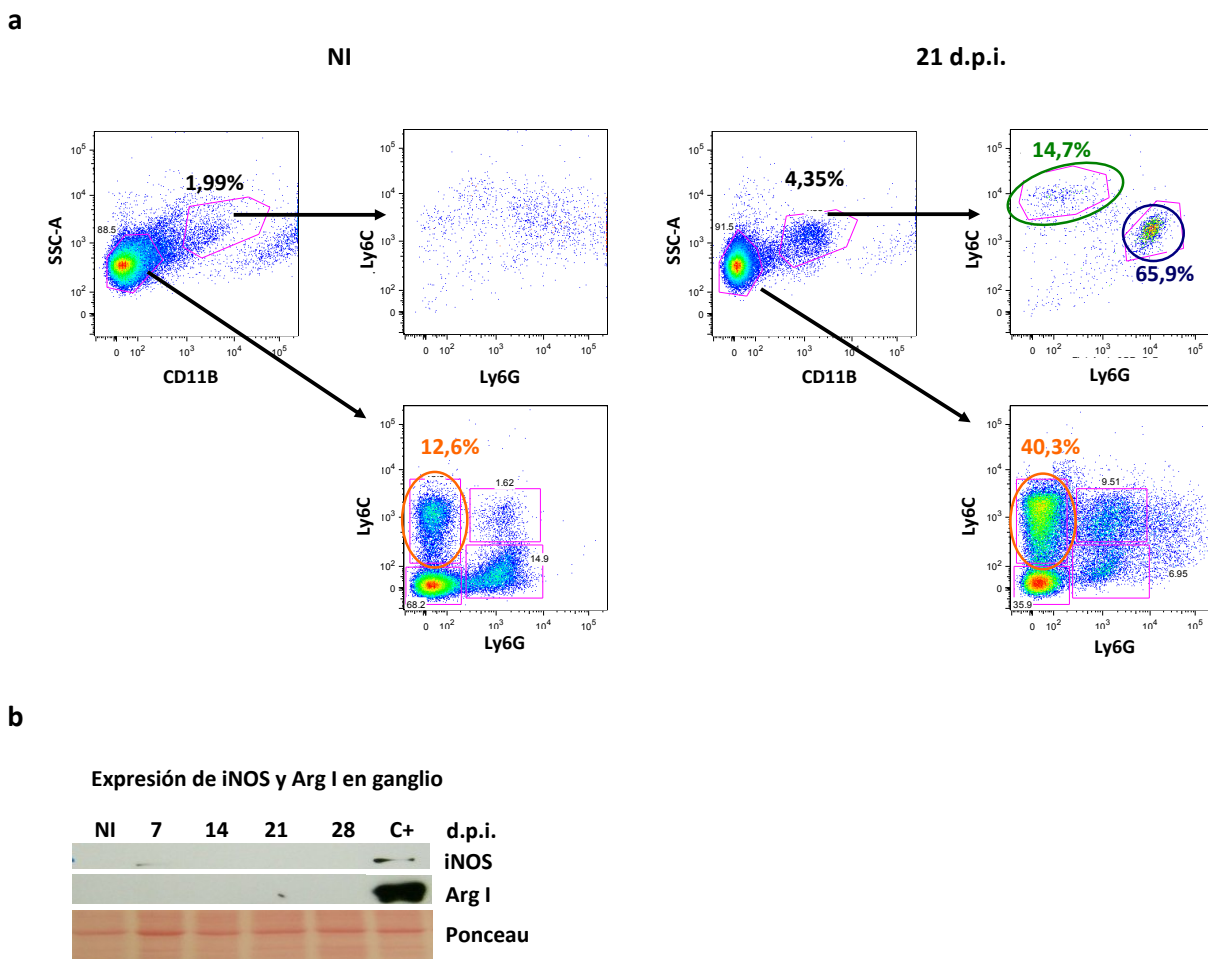
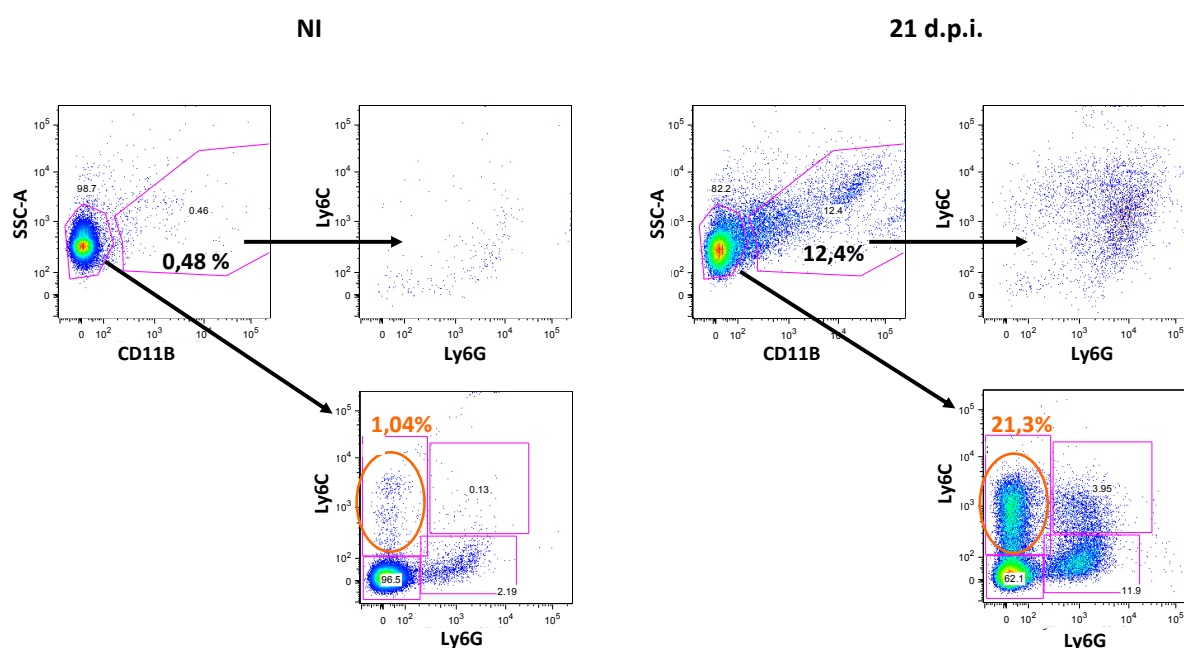


Figura 21. Expresión de marcadores de MDSCs en ganglio. Se extrajeron los ganglios subcutáneos inguinales de ratones BALB/c los días post- infección indicados y se procesaron para extracción de proteínas y citometría de flujo, como se muestra en materiales y métodos. **a)** Ejemplo representativo del análisis de las poblaciones $CD11b^{pos}$ y $CD11b^{neg}$, en función de la expresión de los marcadores Ly6G y Ly6C, en ganglios procedentes de ratones NI y ratones 21 d.p.i. **b)** Análisis de la expresión de las proteínas iNOS y Arg I, por *western blot*, en un *pool* de ganglios procedentes de tres ratones a los diferentes d.p.i. indicados y de corazón 21 d.p.i., como control positivo.

MDSCs en timo

En el timo no aparecieron bien definidas las poblaciones CD11b^{pos}, que se observaban en la médula ósea y en el bazo, ninguno de los días post-infección analizados (Figura 22 a). Sí se observaron, en cambio, las células CD11b^{neg} que veíamos en los otros tejidos, que han resultado no ser supresoras. Por otro lado, sí se detectó la inducción de la expresión de iNOS y Arg I con la infección (Figura 22 b).

a



b

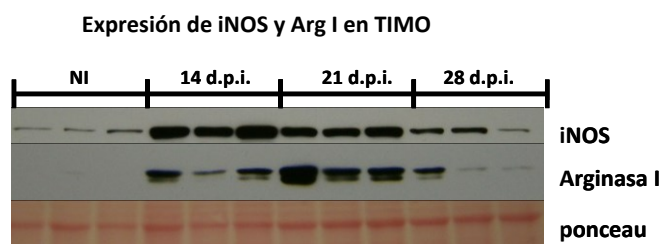


Figura 22. Expresión de marcadores de MDSCs en timo. Se extrajeron los timos de ratones BALB/c los días post-infección indicados y se procesaron para extracción de proteínas y citometría de flujo, como se muestra en materiales y métodos. **a)** Ejemplo representativo de análisis de las poblaciones CD11b^{pos} y CD11b^{neg}, en función de la expresión de los marcadores Ly6G y Ly6C, de timos procedentes de ratones NI y 21 d.p.i. **b)** Análisis, por *western blot*, de la expresión de iNOS y Arg I en timo a los diferentes d.p.i. indicados (n=3).

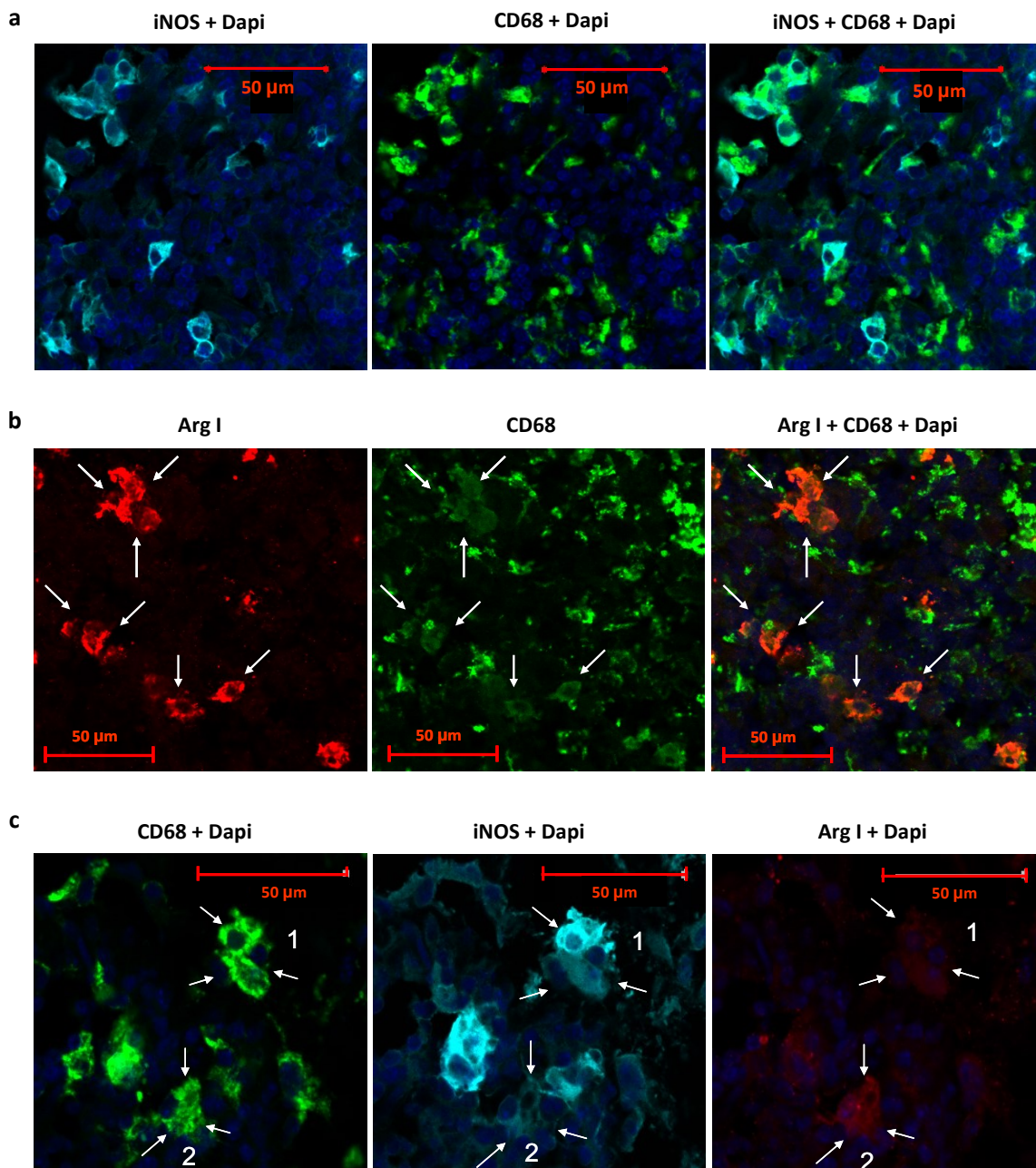


Figura 23. Caracterización de las células que expresan iNOS y Arg I en timo. Se extrajeron los timos de ratones BALB/c infectados a 17 d.p.i. y se procesaron para inmunofluorescencia, como se explica en materiales y métodos. Se muestra expresión de: **a)** iNOS y CD68, **b)** Arg I y CD68 y **c)** iNOS, Arg I y CD68.

A raíz de esta última observación, nos propusimos determinar cuáles eran las células responsables de la expresión de iNOS y Arg I en el timo durante la infección por *T. cruzi*. Para ello, analizamos la expresión de estas enzimas en ratones BALB/c infectados a 17 d.p.i., y vimos que tanto las células iNOS^{pos} como las células Arg I^{pos} son macrófagos CD68^{pos}. Observamos células CD68^{pos} que expresaban: iNOS (Figura 23 a), Arg I (Figura 23 b) o iNOS y Arg I al mismo tiempo (Figura 23 c). Decidimos profundizar un poco más en el estudio del timo y para ello analizamos la expresión de varias citoquinas en este órgano a lo largo de la fase aguda de la infección por *T. cruzi*.

Pudimos observar inducción de *Ifng* y *Tnf*, dos citoquinas capaces de inducir de forma sinérgica la expresión de iNOS. Su inducción coincidió en el tiempo con la mayor expresión de iNOS (*Nos2*) en el timo, por lo que estas citoquinas podrían ser las causantes de la expresión de esta enzima en este órgano, durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*. (Figura 24 a).

Por otro lado, no se detectó inducción de las citoquinas inductoras de Arg I (*Arg1*): *Il13* e *Il4* aunque sí se observó, sin embargo, una tendencia a aumentar la expresión de *Foxp3* y un incremento significativo de ROR γ T (*Rorc*), factores de transcripción que dirigen la diferenciación de las células T reg y las células Th17, respectivamente (Figura 24 b).

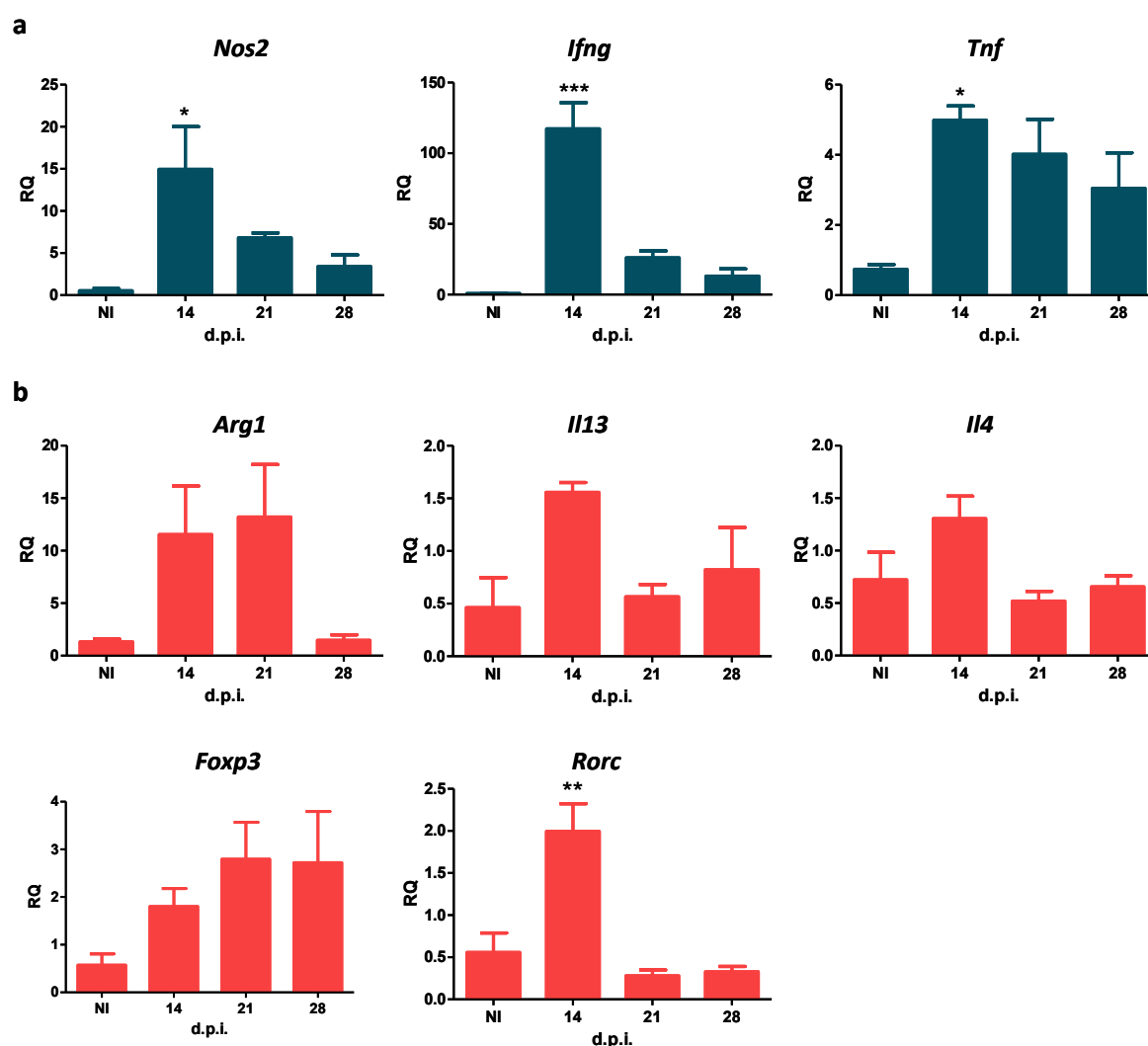


Figura 24. Expresión génica de citoquinas en timo. Se extrajeron los timos de ratones BALB/c a los días post-infección indicados y se procesaron para extracción del RNA y análisis por qPCR, como se muestra en materiales y métodos. **a)** Análisis de la expresión de las citoquinas relacionadas con la inducción de iNOS **b)** Análisis de la expresión de las citoquinas relacionadas con la inducción de Arg I. Se muestran las medias de los RQ +/- SEM (n=3). Se llevaron a cabo análisis estadísticos *one way anova*. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto a los NI.

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

METABOLISMO DE LA L-ARGININA DURANTE LA INFECCIÓN POR *T. cruzi*

Con la idea de estudiar la influencia de las MDSCs en la resistencia de los ratones a la fase aguda de la infección por *T. cruzi* llevamos a cabo un estudio comparativo entre dos cepas de ratón que presentan diferente susceptibilidad a la cepa Y: los ratones BALB/c (susceptibles) y los ratones C57BL/6 (resistentes) (Figura 25 a y b).

En ratones los BALB/c se observó mayor expresión de iNOS y Arg I en corazón que en los ratones C57BL/6, resistentes a ésta, lo cual sugiere que ocurre mayor infiltración de MDSCs en los primeros que en los segundos (Cuervo et al., 2008) y (Figura 25 c).

También observamos que el número de MDSCs obtenidas de bazo fue mayor en los ratones BALB/c que en los ratones C57BL/6 (Figura 25 d), con lo que estas células parecen estar generándose en mayor medida en los ratones susceptibles que en los resistentes. Una de las formas que tienen las MDSCs de ejercer la supresión es mediante la disminución del aminoácido L-arg del medio extracelular. Para determinar si esto está ocurriendo durante la infección por *T. cruzi* analizamos los niveles de L-arg en plasma y pudimos observar que estos disminuyeron en ambas cepas de ratón, durante la fase aguda de la infección. Sin embargo, mientras que los niveles plasmáticos de L-arg se mantuvieron bajos, a lo largo del tiempo, en los ratones BALB/c, éstos se recuperaron rápidamente en los ratones C57BL/6 (Cuervo et al., 2011) y (Figura 25 e).

Estos resultados indican una correlación entre la cantidad de MDSCs en bazo, la expresión de iNOS y Arg I en corazón, la disminución de L-Arg en plasma y la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*.

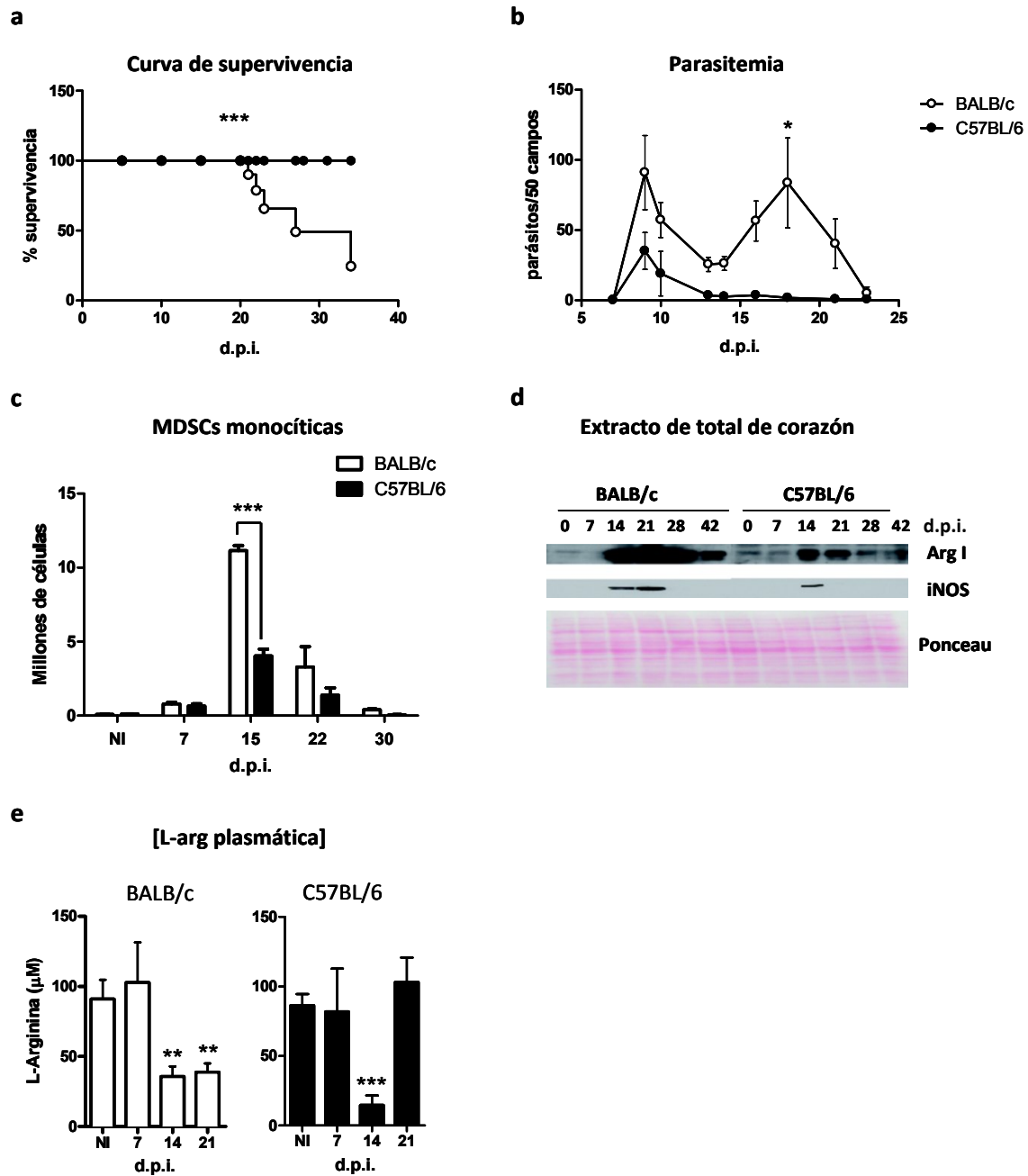


Figura 25. Infección por *T. cruzi*, MDSCs y concentraciones plasmáticas de L-arg en ratones BALB/c vs C57BL/6. Se determinó la supervivencia a diario y la parasitemia cada dos o tres días a lo largo de la fase aguda de la infección por *T. cruzi* en ratones BALB/c y C57BL/6. Los días post-infección indicados se sacrificaron los ratones y se extrajeron los corazones, los bazo y el plasma, que se procesaron para extracción de proteínas, citometría de flujo y análisis por espectrometría de masas, respectivamente, como se explica en material y métodos. **a)** Porcentajes de supervivencia a lo largo del tiempo. Se llevó a cabo el análisis estadístico "Log-rank (Mantel-Cox) Test" para comparar ambas cepas de ratones (n=6) ***p<0,001. **b)** Promedios de las parasitemias +/- SEM (n=6); se llevaron a cabo análisis estadísticos *T de Student* para comparar las dos cepas de ratones *p<0,05. **c)** Análisis de la expresión de iNOS y Arg I, por western blot, en corazón. **d)** Se muestran los promedios +/- SEM (n=3) de las células CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high} totales obtenidas por bazo. Se llevaron a cabo análisis estadísticos *T de Student* para comparar las dos cepas de ratones. ***p<0,001. **e)** Se analizaron las concentraciones de L-arg de las muestras de plasma, mediante espectrometría de masas, en el SIDI (Servicio Interdepartamental de Investigación) de la Universidad Autónoma de Madrid. Se muestran las medias +/- SEM de las concentraciones de L-arg (n=6). Se llevaron a cabo análisis estadísticos *one way anova*. Los asteriscos marcan las diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores obtenidos en los ratones NI. **p<0,01, ***p<0,001.

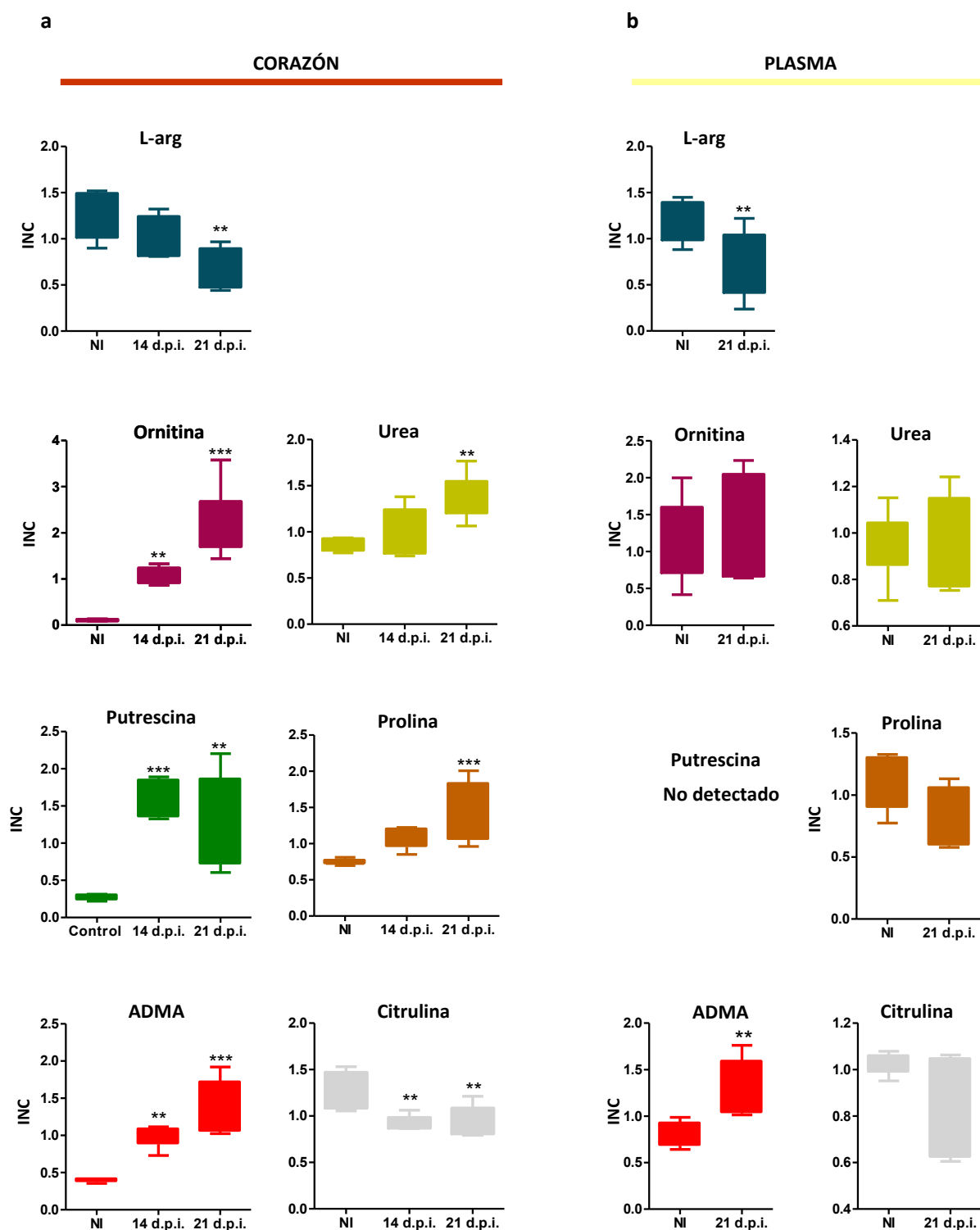


Figura 26: Metabolitos de la L-arg en corazón y en plasma. Se extrajeron los corazones y el plasma de ratones BALB/c a los diferentes d.p.i. indicados y fueron analizados en la empresa Metabolon, mediante cromatografía gaseosa y espectrofotometría de masas (GC/MS) y/o cromatografía líquida y espectrofotometría de masas (LC/MS), para determinar los niveles de los distintos metabolitos, como se explica en materiales y métodos. **a)** Metabolitos derivados del metabolismo de la L-arg en corazón. **b)** Metabolitos derivados del metabolismo de la L-arg en plasma. Se muestran las medias \pm SEM (n=6) INC, datos escalados calculados como se describe en materiales y métodos. Se llevó a cabo el análisis estadístico *T student*. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los ratones infectados y los ratones NI. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Para profundizar más en las alteraciones que el metabolismo de la L-arg está sufriendo durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* decidimos analizar las concentraciones de diferentes metabolitos de este aminoácido en corazón y en plasma de ratones BALB/c durante la infección aguda por *T. cruzi*.

Observamos un incremento de los metabolitos derivados de la actividad Arg I (Urea, Ornitina, prolina y putrescina) en corazón, en los ratones infectados (Figura 26 a). Esto, sumado a que la concentración de L-arg disminuyó significativamente en este órgano, sugiere que la actividad Arg I se incrementa durante la infección causando depleción del aminoácido L-arg, como está descrito en otros modelos de supresión por MDSCs ([Rodriguez et al., 2004](#)).

La citrulina (asociada a la producción de NO por la iNOS) también disminuyó durante la infección, en corazón. Esto podría ser debido a la disminución de L-arg que podría estar causando, a su vez, una disminución en la producción de NO (a pesar de que la expresión de la enzima iNOS también se induce con la infección). Aunque también podría ser efecto de la acción del asimétrico-dimetilarginina (ADMA), que observamos aumenta de forma significativa con la infección (Figura 26 a). Este es un derivado metilado de la L-arg, procedente de la proteólisis de proteínas, que suele acumularse en situaciones de estrés oxidativo, y presenta una fuerte actividad inhibidora de la iNOS ([Beltowski and Kedra, 2006](#)).

En plasma también se observó una disminución de la concentración de L-arg, un incremento significativo de ADMA y una tendencia a aumentar las concentraciones de Urea y Ornitina, y a disminuir la concentración de citrulina (Figura 26 b). Datos que corroboran una actividad Arg I incrementada con la infección en detrimento de la actividad NOS. Sin embargo, a diferencia de lo que se observó en corazón, la prolina tendió a disminuir y la putrescina no se detectó.

Efecto del suplemento de L-arg durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*

Si los bajos niveles de L-arg tienen efectos en el desarrollo de la infección estos desaparecerán si se recuperan los niveles fisiológicos de este aminoácido. Por ello decidimos suplementar L-arg a los ratones, en el agua de bebida, o mediante inyección intraperitoneal, a lo largo de la fase aguda de la infección por *T. cruzi*.

Suplementando L-arg en el agua de bebida durante la infección, se consiguió revertir la deficiencia plasmática de L-arg, (Figura 27 a). Pudimos observar que los ratones suplementados con L-arg presentaron menor parasitemia a partir del día 17 post-infección, pasado el primer pico de parasitemia, cuando en los ratones control empezaba a disminuir la L-arg en plasma (Figura 27 b). La carga parasitaria en corazón a 21 d.p.i. también fue significativamente menor en los ratones suplementados con L-arg en el agua de bebida que en los ratones control (Figura 27 c). Estos últimos, a su vez, presentaron peor *score* clínico que los ratones suplementados (Figura 27 d). Por último estudiamos la supervivencia a diario y observamos un incremento, a día 35 post-infección, de entre el 80% y el 100% en la supervivencia de los ratones suplementados con L-arg, en el agua de bebida o por vía I.P., respectivamente (Figura 27 e); por lo que, concluimos, que el suplemento de L-arg aumenta la resistencia a la fase aguda de la infección por *T. cruzi*.

A continuación nos propusimos determinar el/los mecanismos mediante los cuales la L-arg ejerce sus efectos beneficiosos en la resolución de la fase aguda de la infección por *T. cruzi*.

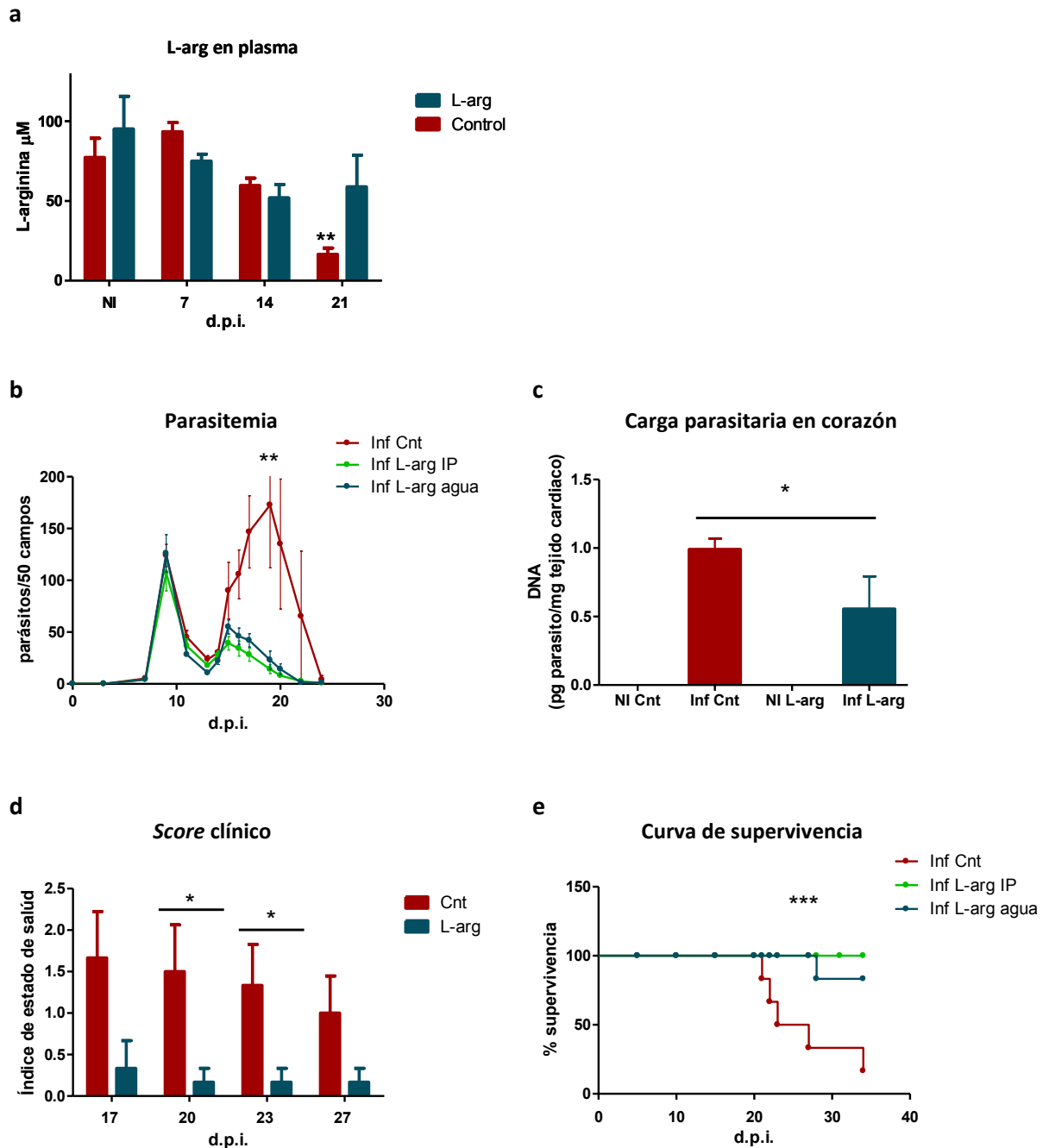


Figura 27: Parámetros generales en ratones infectados por *T. cruzi* y suplementados con L-arg. Un grupo de ratones BALB/c fue suplementado con L-arg intraperitoneal (L-arg IP, en verde), otro con L-arg en el agua de bebida (L-arg agua, azul) y un tercer grupo sin suplementar (Cnt, en rojo). **a)** Se extrajeron los plasmas los d.p.i. indicados y se analizaron en el SIDI de la UAM para determinar las concentraciones de L-arg mediante espectrometría de masas. Se muestran las medias \pm SEM de las [L-arg] (n=3). Se llevaron a cabo análisis estadísticos *one way anova*. Los asteriscos reflejan diferencias significativas frente a los valores obtenidos de los NI **p<0,01. **b)** Se muestran las medias \pm SEM de las parasitemias obtenidas por cada grupo de estudio (n=6) de un experimento representativo de 4 experimentos independientes. Se llevaron a cabo análisis estadísticos de *T de Student* para comparar los grupos suplementados con el grupo control sin suplementar. **c)** Se extrajeron los corazones de ratones NI y 21 d.p.i. y se procesaron para extracción de DNA y posterior qPCR para cuantificar el DNA del parásito. Se muestran las medias \pm SEM de los valores de pg de parásito/mg de tejido cardíaco. Se llevó a cabo el análisis estadístico *T de Student*. **d)** Se muestran las medias \pm SEM de valores de *score* clínico asignados teniendo en cuenta diferentes parámetros del estado físico de los ratones (pelo erizado, coloración, falta de movilidad, etc); siendo 0 el valor mínimo de signos de enfermedad y 4 el valor máximo. Se llevaron a cabo análisis estadísticos de *T de Student*. **e)** Curva de supervivencia. Se llevó a cabo el análisis estadístico *Log-rank (Mantel-Cox) Tes* (n=6). Los asteriscos muestran diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los ratones *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

RESULTADOS

Efecto del suplemento de L-arg en la expresión de la cadena ζ del CD3

Con idea de ver si la disminución de L-arg está afectando la expresión de la cadena ζ del CD3 durante la infección por *T. cruzi*, como está descrito en otros modelos (Rodriguez et al., 2002), analizamos la expresión de esta proteína en corazón y en bazo a diferentes días post-infección en ratones suplementados con L-arg y ratones sin suplementar.

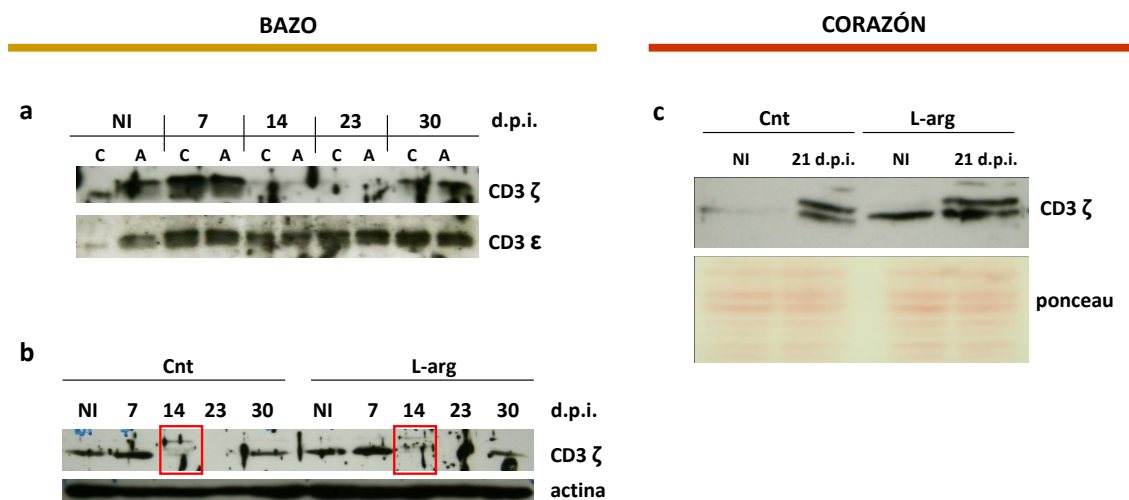


Figura 28: Expresión de la cadena ζ del CD3 en corazón y esplenocitos de ratones infectados con *T. cruzi* y suplementados con L-arg. a) Análisis por *western blot* de la expresión de la cadena ζ del CD3 y de la cadena ϵ del CD3, como control de CD3 total, en un *pool* de extractos de esplenocitos procedentes de tres ratones BALB/c suplementados con L-arg en el agua de bebida (A) y tres ratones BALB/c control sin suplementar (C). c) Análisis por Western Blot de la expresión de la cadena ζ del CD3 y actina, en un *pool* de extractos de esplenocitos procedentes de tres ratones BALB/c suplementados con L-arg en el agua de bebida (L-arg) y tres ratones BALB/c control sin suplementar (Cnt). b) Análisis por Western Blot de la expresión de la cadena ζ del CD3 en un *pool* de tejido cardíaco procedente de tres ratones BALB/c suplementados con L-arg en el agua de bebida (L-arg) y tres ratones BALB/c control sin suplementar (Cnt).

En bazo se observó la inhibición de la expresión de la cadena ζ del CD3 a 14 y a 23 d.p.i., pero esta inhibición no se revirtió en los ratones suplementados con L-arg (Figura 28 a y b), lo cual sugiere que, o no se suplementó la suficiente L-arg u otros mecanismos no dependientes de este aminoácido están mediando esta supresión.

Por otro lado, se detectaron modificaciones de la cadena ζ del CD3, probablemente fosforilaciones, en los ratones infectados que no se observaron en los ratones NI (Figura 28 b y c). Está descrito que la inhibición de la expresión de la cadena ζ del CD3 también puede ocurrir a causa de bajas concentraciones de triptófano sumado a altas concentraciones de Kinureninas (metabolitos derivados del triptófano) en el medio extracelular, fruto de la actividad sostenida de la enzima indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) (Fallarino et al., 2006). También está descrita la activación de esta enzima en la infección por *T. cruzi* (Knubel et al., 2010). Debido a esto, decidimos analizar las concentraciones de triptófano y kinurenina, en extracto de corazón y en plasma, de ratones infectados y sin infectar por *T. cruzi*.

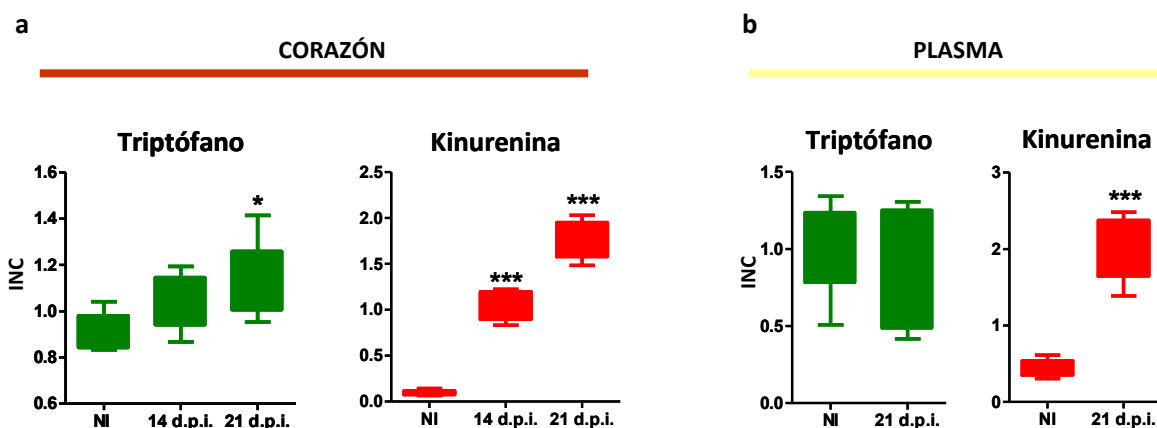


Figura 29: Triptófano y Kinurenina en corazón y en plasma de ratones infectados por *T. cruzi*. Se extrajeron los corazones y el plasma de ratones BALB/c NI y 21 d.p.i. que fueron analizados en la empresa Metabolon, mediante cromatografía gaseosa y espectrofotometría de masas (GC/MS) y/o cromatografía líquida y espectrofotometría de masas (LC/MS), para determinar los niveles de los diferentes metabolitos, como se explica en materiales y métodos. **a)** Triptófano y Kinurenina en corazón. **b)** Triptófano y Kinurenina en plasma. Se muestran las medias \pm SEM (n=6) de los INC, datos escalados calculados como se explica en materiales y métodos. Se llevó a cabo el análisis estadístico *T student*. Los asteriscos muestran diferencias significativas entre los ratones infectados y los ratones NI. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Observamos un incremento muy significativo en la concentración de Kinurenina en corazón que no fue acompañada por una disminución en la concentración de triptófano, que curiosamente aumentó (Figura 29 a).

En plasma, se observó también un fuerte aumento de kinurenina y una tendencia a disminuir el triptófano (Figura 29 b). Es probable que estas alteraciones sistémicas del metabolismo del triptófano sean, en parte, responsables de la disminución en bazo de la expresión de la cadena ζ del CD3, durante la infección, y que por eso, esta no se recupere con el suplemento de L-arg.

Efecto del suplemento de L-arg en la activación de las rutas de mTOR y GCN2

Está descrito que un déficit de L-arg inhibe la actividad de la quinasa mTOR, ya que la activación de esta requiere de la presencia de este aminoácido, entre otros. La ruta de señalización de mTOR se activa, cuando hay disponibilidad de factores nutricionales, energéticos y de crecimiento, para promover procesos anabólicos y suprimir procesos catabólicos y de autofagia. La señalización está mediada por la fosforilación de la quinasa P70S6K que a su vez fosforila al factor de iniciación de la traducción 4E-BP1 que controla la traducción de multitud de mRNAs, muchos también implicados en la regulación del sistema inmune (Delgoffe et al., 2009).

RESULTADOS

Por otro lado, la deficiencia de L-arg, al igual que la de otros aminoácidos, da lugar a la activación de la kinasa de control de estrés nutricional GCN2 que fosforila y reprime al factor de iniciación de la traducción en eucariotas eIF2 α . Este regula la traducción de múltiples mRNAs, muchos de ellos implicados en la regulación del sistema inmune (Sundrud et al., 2009).

Con idea de analizar si la deficiencia de L-arg durante la infección por *T. cruzi* causa un estrés nutricional que puede ser revertido con el suplemento de este aminoácido, analizamos la expresión de P70S6K-fosf, como marcador de la ruta de activación de mTOR, y de eIF2 α -fosf, como marcador de la ruta de GCN2, a lo largo de la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, en ratones suplementados con L-arg y en ratones control.

Si la deficiencia de L-arg está causando estrés nutricional ocurrirá, por un lado, un incremento en la fosforilación de eIF2 α y, por el otro, una disminución en la fosforilación de P70S6K. Ambos estados de fosforilación deberían revertirse con el suplemento de L-arg.

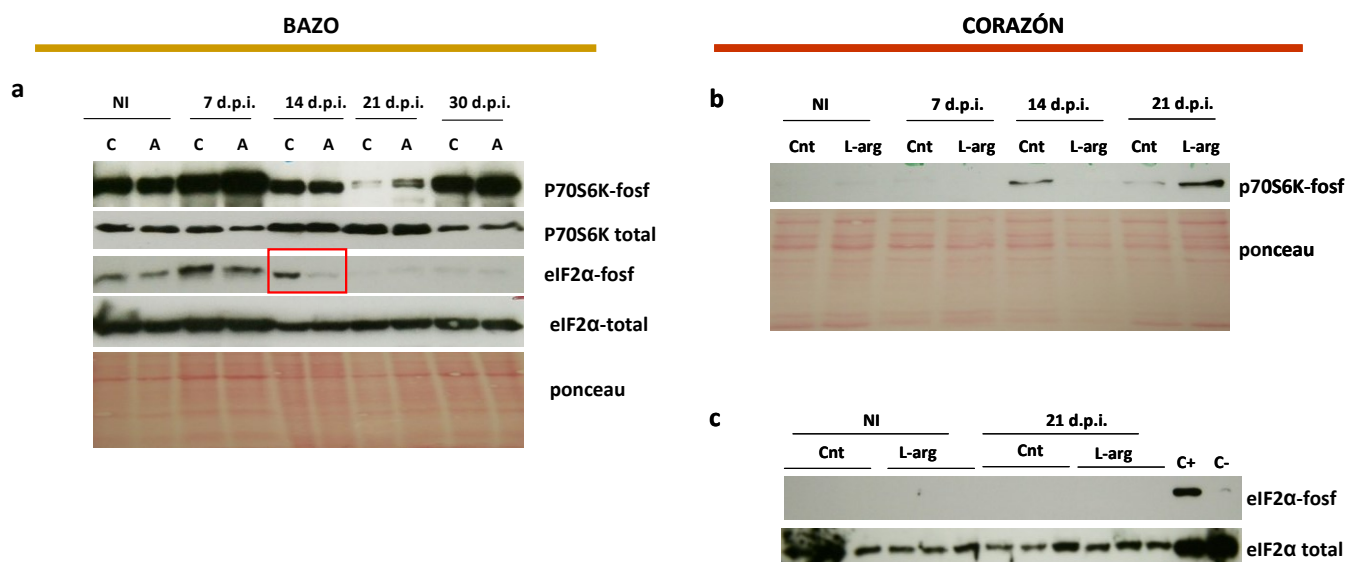


Figura 30. Expresión de indicadores de estrés nutricional en bazo y corazón de ratones infectados con *T. cruzi* suplementados con L-arg. **a)** Análisis por *western blot* de la expresión de p70s6K-fosf y p70s6K total, eIF2 α - fosf y eIF2 α total en un *pool* de esplenocitos procedentes de tres ratones BALB/c suplementados con L-arg en el agua de bebida (A) y tres ratones BALB/c control sin suplementar (C). **b)** Análisis por *western blot* de la expresión de p70s6K-fosf en un *pool* de tejido cardiaco procedente de tres ratones BALB/c suplementados con L-arg en el agua de bebida (L-arg) y un *pool* de tres ratones BALB/c control sin suplementar (Cnt). **c)** Análisis por *western blot* de la expresión de eIF2 α -fosf y eIF2 α en un *pool* de tejido cardiaco procedente de tres ratones BALB/c suplementados con L-arg en el agua de bebida (L-arg) y tres ratones BALB/c control sin suplementar (Cnt).

En bazo (Figura 30 a) la actividad de mTOR disminuyó a 14 y 21 d.p.i., días en los que habíamos detectado previamente menores concentraciones de L-arg. Por su parte, el suplemento de L-arg, activó a mTOR, como correspondería, los días 7, 21 y 30 post-infección, en los cuales se observó mayor presencia de P70s6K-fosf en las muestras procedentes de ratones suplementados con L-arg que en las muestras procedentes de ratones sin suplementar.

En corazón la infección activó la ruta de mTOR observándose P70s6K-fosf a 14 y a 21 d.p.i., aunque desconocemos si esto se debe a la infiltración de células con la infección o a la fosforilación de P70s6K de células cardíacas. Sólo a 21 d.p.i. esta fosforilación se vio incrementada con el suplemento de L-arg como se esperaba (Figura 30 b).

En cuanto a la ruta de GCN2, no se detectó eIF2 α -fosf en corazón durante la infección por *T. cruzi* (Figura 30 b). En bazo, en cambio sí se observó fosforilación de eIF2 α en los esplenocitos procedentes de ratones NI pero ésta no fue aumentando con la infección en los ratones control, sin suplementar, como se hubiera esperado si esta fosforilación se debiera a las bajas concentraciones de L-arg (Figura 30 a). Sólo a 14 d.p.i. (recuadro rojo) se observó mayor fosforilación en los ratones control que en los suplementados con L-arg, pero no fue concluyente, ya que los siguientes días pos-infección también disminuyó la fosforilación de eIF2 α en los ratones control. Probablemente, las variaciones en los niveles de eIF2 α -fosf que se observaron tuvieron más que ver con variaciones en la frecuencia de las distintas poblaciones a lo largo de la infección que con variaciones en la actividad kinasa de GCN2 debido a estrés nutricional por el déficit de L-arg.

También es posible que existan diferencias en los niveles de otros aminoácidos que puedan influir en la estimulación de estas quinasas.

Efecto del suplemento de L-arg en la producción de NO

Por otro lado, el suplemento de L-arg puede estar fomentando una mayor producción de NO que si bien puede tener efectos supresores en la proliferación de las células T también posee un efecto tripanocida *in vitro* e *in vivo* (Gutierrez et al., 2009; Munoz-Fernandez et al., 1992).

Para determinar si el suplemento de L-arg genera un aumento en la producción de NO durante la infección por *T. cruzi* analizamos la concentración de nitritos, como medida indirecta de producción de NO, en plasma y en extracto total de corazón.

Tanto en extracto de corazón como en plasma, se observó una tendencia hacia una mayor producción de NO₂ en los ratones suplementados con L-arg que en los ratones controles sin suplementar. Aunque el incremento no fue estadísticamente significativo, debido a la variabilidad entre animales y a la falta de sensibilidad de la técnica, este se pudo apreciar todos los días analizados (Figura 31).

Por otro lado, en plasma se observa aumento de la producción de NO₂ en ambos grupos de ratones a partir del día 14- 21 d.p.i., coincidente con la inducción de la expresión de iNOS en todos los tejidos analizados.

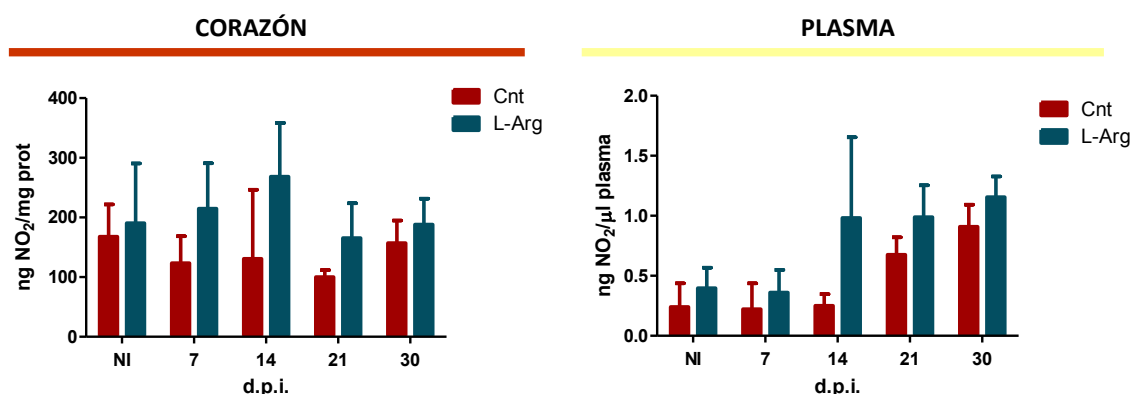


Figura 31. Análisis de producción de NO₂ en extracto de tejido cardíaco y plasma: Suplemento de L-arg. Se extrajeron corazones y plasma de ratones BALB/c suplementados con L-arg en el agua de bebida (L-arg) y de ratones BALB/c sin suplementar (Cnt). Se procesaron para el análisis de la concentración de NO₂ mediante el ensayo de Griess. Se muestran las medias \pm SEM de un experimento realizado por triplicado. Se llevaron a cabo análisis estadísticos *T de Student* para comparar los dos grupos de estudio.

Efecto tripanocida de la L-arg

Tratamos de determinar *in vitro* si un aumento de L-arg en el medio extracelular tiene efectos en la capacidad tripanocida de los macrófagos.

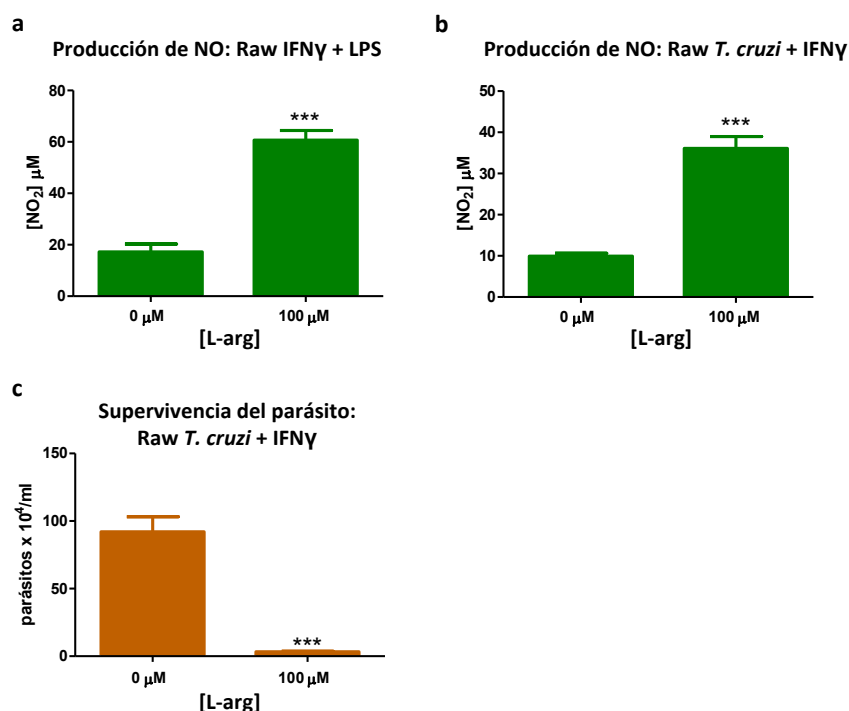


Figura 32. Efecto tripanocida del suplemento de L-arg. Macrófagos Raw 264.7 fueron tratados con IFN γ + LPS o IFN γ + infección con tripomastigotes en una relación 10:1, en medio RPMI a [L-arg] = 0 μ M o [L-arg] = 100 μ M, como se explica en materiales y métodos. Se analizaron, mediante el ensayo de Griess, las concentraciones de los NO₂ en el sobrenadante a las 72 h de cultivo. **a)** Se muestran las medias \pm SEM (n=3) de las [NO₂] en el sobrenadante de cultivo de las células Raw 264.7 tratados con IFN γ + LPS. **b)** Se muestran las medias \pm SEM (n=3) de las [NO₂] en el sobrenadante de cultivo de las células Raw 264.7 tratados con IFN γ + *T. cruzi*. **c)** Se contabilizó el número de tripomastigotes en el medio de cultivo a los 7 días. Se muestran las medias \pm SEM (n=3) del número de tripomastigotes en el sobrenadante de cultivo. Se llevaron a cabo análisis estadísticos *T de student* para comparar las dos condiciones. ***p<0,001.

Observamos que un aumento en la concentración extracelular de L-arg dio lugar a una mayor producción de NO_2 en macrófagos Raw 264.7 estimulados con IFN γ y LPS (Figura 32 a) y estimulados con IFN γ e infección por *T. cruzi* (Figura 32 b). Además, pudimos determinar que la L-arg es imprescindible para que los macrófagos eliminen al parásito (Figura 32 c), ya que en ausencia de este aminoácido las células Raw 264.7 no fueron capaces de destruir al parásito y el ciclo infectivo siguió su curso generándose nuevos tripomastigotes.

Efecto del suplemento de L-arg cuando la iNOS está inhibida

Para corroborar *in vivo* la importancia de la producción de NO en la resistencia mediada por la L-arg, llevamos a cabo un experimento combinando el suplemento de L-arg con un inhibidor específico de la iNOS.

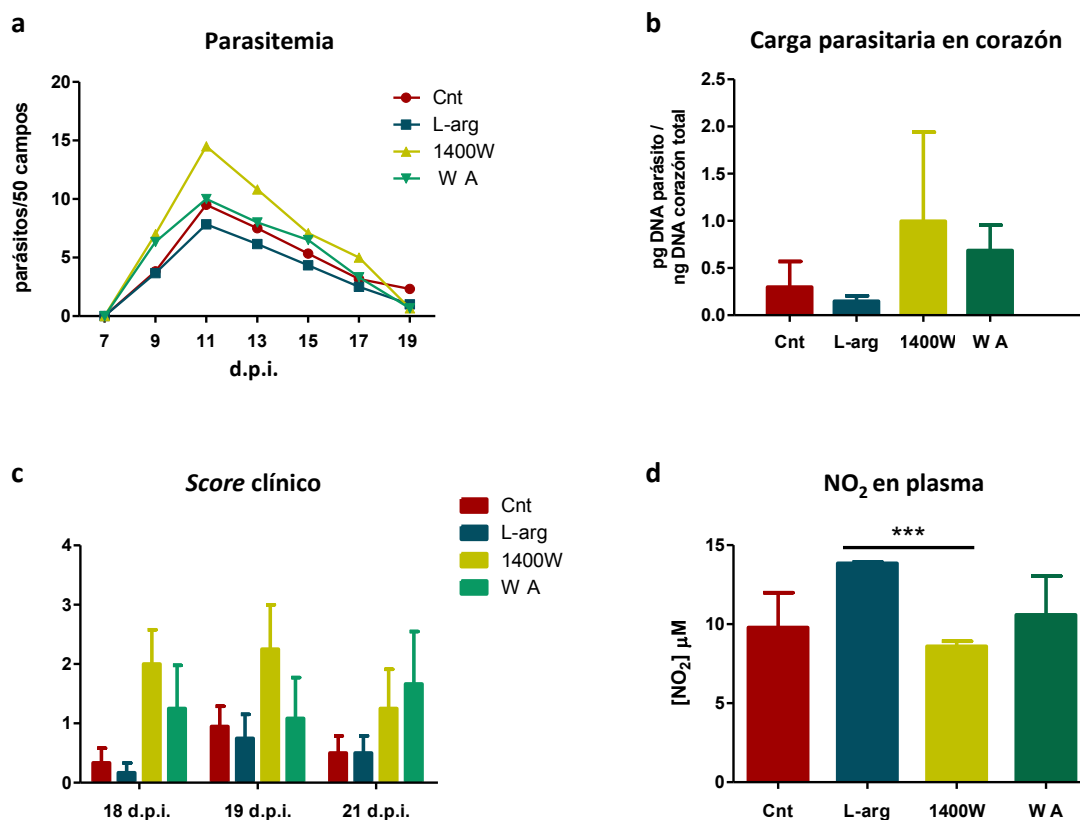


Figura 33. Parámetros generales de ratones infectados por *T. cruzi*, suplementados con L-Arg y tratados con un inhibidor específico de la iNOS. Un grupo de ratones BALB/c fue suplementado con L-arg en el agua de bebida (L-arg), otro intraperitonealmente con el inhibidor 1400W, otro con la combinación de ambos tratamientos (1400W + L-arg, WA) y un tercer grupo sin suplementar ni tratar (Cnt). **a)** Se muestran las medias \pm SEM (n=6). **b)** Se extrajeron los corazones de ratones infectados a 20 d.p.i. y se procesaron para extracción de DNA y posterior qPCR para detectar DNA del parásito. Se muestran las medias \pm SEM de los valores de pg de parásito/ng de DNA total (n=3). **c)** Se muestran las medias \pm SEM de valores de score clínico asignados teniendo en cuenta diferentes parámetros del estado físico de los ratones; siendo 0 el valor mínimo de signos de enfermedad y 4 el valor máximo. **d)** Se extrajeron los plasmas de los ratones infectados a 20 d.p.i. y se analizaron las concentraciones de NO_2 , mediante el ensayo de Griess. Se muestran las medias \pm SEM (n=3) de las $[\text{NO}_2]$. Se llevaron a cabo análisis estadísticos *T de student* comparando entre sí todos los grupos de estudio. *** $p < 0,001$.

A diferencia de lo observado en los casos anteriores, en este experimento la infección no fue muy agresiva en ninguno de los grupos experimentales. Todos los ratones presentaron bajas parasitemias y sólo murió un animal del grupo tratado con el inhibidor 1400W. Por esa razón no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros analizados, entre los diferentes grupos. A pesar de eso, se pudo apreciar que los ratones tratados con el inhibidor de la iNOS 1400W fueron los que peor resolvieron la infección ya que presentaron mayores parasitemias (Figura 33 a), mayor carga parasitaria en corazón (Figura 33 b) y peor *score* clínico (Figura 33 c). Y que, por el contrario, los ratones suplementados con L-arg, aunque no difirieron mucho de los ratones control, presentaron las menores parasitemias (Figura 33 a), la menor carga parasitaria en corazón (Figura 33 b) y el mejor *score* clínico (Figura 33 c).

Para comprobar el efecto de los tratamientos en la producción de NO analizamos las concentraciones de NO₂ en los plasmas de los ratones (Figura 33 d). Probablemente debido a la poca agresividad de la infección en este experimento y a la baja sensibilidad del ensayo, no se observaron muchas diferencias entre los diferentes grupos de estudio. Solo se detectaron diferencias significativas entre los grupos de tratamientos más extremos detectándose mayor producción de NO en los ratones suplementados con L-arg que en los ratones tratados con el inhibidor de la iNOS 1400W.

En cualquier caso, se puede apreciar que los ratones con el tratamiento combinado 1400W + L-arg se asemejan más a los ratones tratados con 1400W que a los suplementados con L-arg, lo cual sugiere, que para que se den los efectos beneficiosos de la L-arg se requiere una óptima producción de NO.

Por lo tanto, un incremento en la producción de NO que de lugar a mayor muerte del parásito puede ser la causa que explique los efectos beneficiosos del suplemento del aminoácido L-arg durante la infección por *T. cruzi*.

Efecto del suplemento de L-arg y la inhibición de la iNOS en la hematopoyesis durante la infección por *T. cruzi*

Por último quisimos analizar si el suplemento de L-arg y/o la inhibición de la iNOS tienen algún efecto en la supresión de la hematopoyesis en médula ósea o la supresión de la timopoyesis en timo. Como medida sencilla de supresión de la hematopoyesis en médula ósea determinamos los porcentajes de precursores de eritrocitos en este órgano y para determinar la timopoyesis medimos los porcentajes de timocitos DN en el estadio 3 y el porcentaje de timocitos DP.

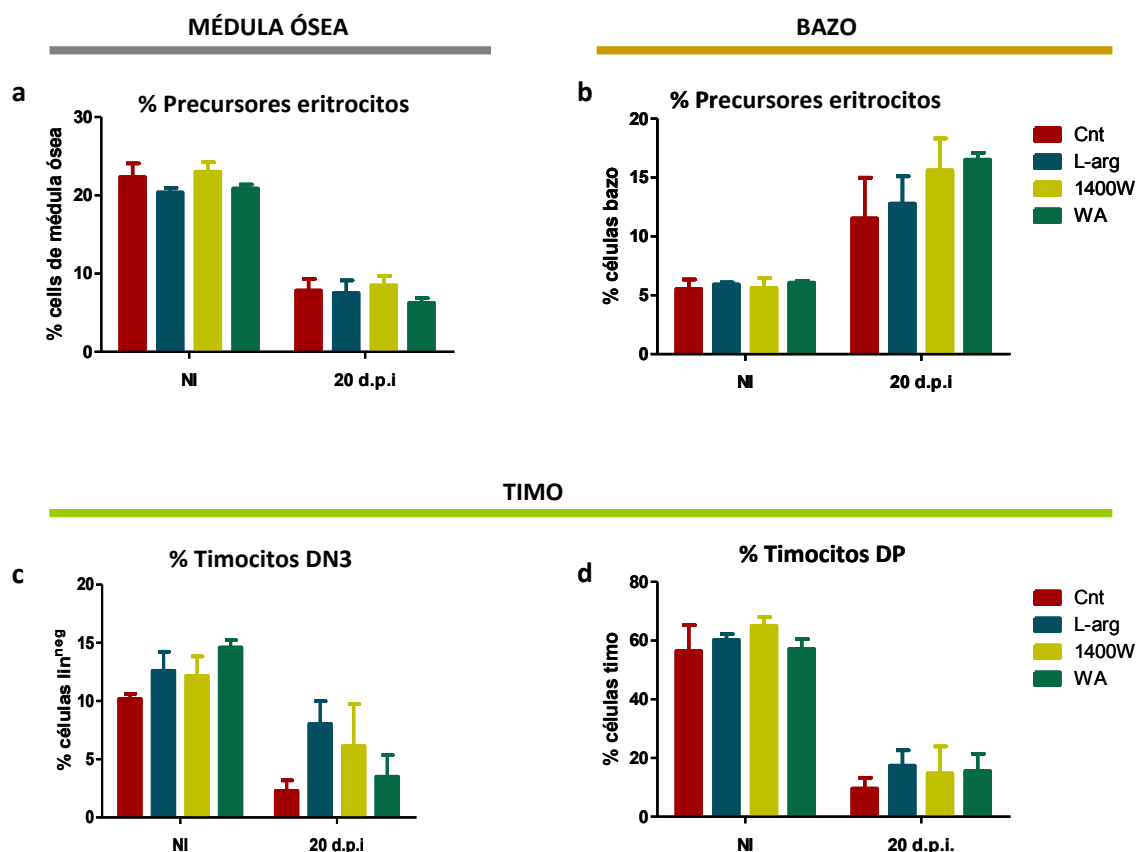


Figura 34. Supresión de eritropoyesis y timopoyesis en ratones infectados por *T. cruzi*, suplementados con L-arg y tratados con un inhibidor de la iNOS. Un grupo de ratones BALB/c fue suplementado con 3,75mg/ml de L-arg en el agua de bebida cada dos días (L-arg), otro tratado a diario mediante inyección intraperitoneal con 20mg/Kg ratón del inhibidor 1400W, otro con la combinación de ambos tratamientos (1400W + L-arg, WA) y un tercer grupo sin suplementar ni tratar (Cnt). Se sacrificaron 3 ratones NI y 3 ratones a 20 d.p.i. de cada grupo de estudio y se extrajeron las médulas óseas, los bazo y los timos, que fueron procesados para citometría de flujo, como se explica en materiales y métodos. Se muestran las medias \pm SEM (n=3) de los porcentajes de células obtenidas por cada grupo de estudio de: **a)** células CD71^{pos} Ter119^{pos} de médula ósea; **b)** células CD71^{pos} Ter119^{pos} de bazo; **c)** células Lin^{neg} CD44^{neg} CD25^{pos} de timo y **d)** células CD4^{pos} CD8^{pos} de timo. Se llevaron a cabo análisis estadísticos *T de Student* para comparar los diferentes grupos de estudio.

A pesar de la poca agresividad de la infección se siguieron observando alteraciones en la hematopoyesis durante la fase aguda. Sin embargo, la eritropoyesis se suprimió en la médula ósea y se compensó en bazo de la misma forma en todos los grupos de estudio. En cuanto a los timocitos DN, se detectó un ligero incremento en la proporción de timocitos DN3 en los ratones suplementados con L-arg, en cualquier caso, este no fue significativo y no afectó a la proporción de timocitos DP, que se observó sin diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio. Estos resultados preliminares sugieren que, ni el suplemento de L-arg ni la actividad iNOs, parecen tener efectos sobre las alteraciones que sufre la hematopoyesis durante la infección aguda por *T. cruzi* (Figura 34).

DISCUSIÓN

ALTERACIONES EN LA HEMATOPOYESIS DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA POR *T. cruzi*: MÉDULA ÓSEA Y BAZO

La hematopoyesis es un proceso homeostático esencial mediante el cual las células de la sangre y del sistema inmune se reponen constantemente. El estrés (como el inducido por una infección, lesión o inflamación) tiene efectos profundos en la hematopoyesis (MacNamara et al., 2009). En este trabajo, hemos estudiado los efectos que tiene la infección aguda por *T. cruzi* en la hematopoyesis. En primer lugar observamos que durante la fase aguda de la infección ocurre una hipoplasia de la médula ósea, que se revierte al final de la fase aguda, cuando el parásito comienza a ser menos abundante en sangre. Estudios previos han relacionado el nivel de reducción de la celularidad en médula ósea con la supervivencia de ratones a la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, siendo una reducción menor de un 40% (con respecto a la celularidad total de los ratones NI) pronóstico de supervivencia, mientras que una reducción mayor de un 60% pronóstico de mortalidad (Marcondes et al., 2000). Al analizar las diferentes poblaciones celulares encontramos que las células LSK presentaron tendencia a aumentar a lo largo de la fase aguda de la infección. Este efecto se ha descrito en numerosos modelos (Baldrige et al., 2011) y se ha relacionado con la capacidad intrínseca que tiene el sistema hematopoyético de adaptarse y responder a una situación de estrés en la cual se requiera una mayor producción de células.

Por otro lado, pudimos determinar que tanto los CMPs como los CLPs disminuyeron durante la infección, por lo que un precursor común a ambos linajes podría estar siendo afectado, aunque también podría estar ocurriendo una supresión independiente de los dos linajes a la vez.

También observamos disminución del número de células pre + pro B y de células B inmaduras en médula ósea, que podría ser causada por la reducción del número total de sus precursores CLP. Sin embargo, también parece estar ocurriendo una supresión directa de las células B inmaduras, ya que observamos que estas células se recuperan antes que sus precursores pre + pro B. De hecho, la supresión de la linfopoyesis B en médula ósea, durante la infección por *T. cruzi*, ha sido descrita previamente (Zuniga et al., 2005), y fue asociada a la apoptosis directa de las células B inmaduras y no a la falta de sus precursores. En cualquier caso, las dos posibilidades no son excluyentes ya que la hematopoyesis puede estar siendo afectada en varios niveles. Observamos que la disminución de los precursores de células B correlaciona con la práctica desaparición de las células B maduras recirculantes en médula ósea, lo cual sugiere la influencia que tiene la linfopoyesis B de médula ósea en los niveles que hay de células B en circulación. Fenómenos similares han sido descritos en infección por el virus influenza (Sedger et al., 2002) o el virus de la coriomeningitis linfocítica (Borrow et al., 2005) y también en otras infecciones parasitarias,

como la infección por *T. brucei*, donde se observó una reducción de hasta un 95 % de todos los precursores de células B desde los CLPs, pre-pro-B, pro-B, pre-B hasta las células B inmaduras en médula ósea (Bockstal et al., 2011). La causa de la disminución de la linfopoyesis B en médula ósea ha sido atribuida tanto a la movilización de células progenitoras a la periferia (Ueda et al., 2004) como a la apoptosis directa de estas en la propia médula ósea (Sedger et al., 2002). En ambos casos se vio involucrada la citoquina TNF- α . La infección por *T. cruzi* induce un incremento sistémico de los niveles de TNF α que podrían explicar estas alteraciones (Sanoja et al., 2013). Una linfopoyesis B reducida ha sido asociada a defectos en la respuesta inmune humoral durante infecciones (Borrow et al., 2005).

También observamos supresión de la eritropoyesis y de la mielopoyesis en médula ósea. Esto ya fue descrito en la infección por *T. cruzi*, utilizando otra metodología experimental diferente (Marcondes et al., 2000), y se asoció a las alteraciones hematológicas (como anemia, leucopenia y trombocitopenia) descritas en esta infección (Cardoso and Brener, 1980; Marcondes et al., 2000). Lo mismo ocurre en otros ejemplos de infecciones parasitarias como la infección por *Plasmodium chabaudi* (Belyaev et al., 2013) o infección por *T. brucei* (Stijlemans et al., 2010), infecciones con bacterias Gram negativas intracelulares como *Anaplasma phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*) (Johns et al., 2009) y *Ehrlichia muri* (*E. muris*) (MacNamara et al., 2009) o en multitud de infecciones virales (Rosenfeld and Young, 1991), en las cuales también ocurren disfunciones en la hematopoyesis que se asocian a anormalidades hematológicas.

La reducción de la mielopoyesis y la eritropoyesis en médula ósea, fundamentalmente, se ha relacionado con la movilización de los progenitores mieloides desde la médula ósea a órganos periféricos como el bazo (Belyaev et al., 2013; Johns et al., 2009).

La movilización de progenitores mieloides y linfoides a órganos periféricos provoca que estos finalicen su diferenciación fuera de la médula ósea, induciéndose la llamada hematopoyesis extramedular (Belyaev et al., 2013; MacNamara et al., 2010; Ueda et al., 2004). Aunque este fenómeno también puede ocurrir, para compensar disfunciones de la médula ósea, mediante la inducción de precursores ya presentes en los órganos secundarios (Kim, 2010; Sohawon et al., 2012).

Nosotros hemos observado un incremento de eritropoyesis extramedular en bazo. Este fenómeno es común en infecciones donde ocurre supresión de eritropoyesis en médula ósea (Johns et al., 2009; MacNamara et al., 2009; Stijlemans et al., 2010) y se ha asociado a casos de ACD, anemia que se desarrolla como consecuencia de una respuesta inflamatoria sostenida (Stijlemans et al., 2010). La hipoxia en los tejidos resulta en la activación de una respuesta

fisiológica llamada eritropoyesis por estrés, diseñada para la rápida generación de gran cantidad de eritrocitos, que se suele dar en bazo y en hígado (Paulson et al., 2011).

Por otro lado, la linfopoyesis B extramedular ha sido descrita fundamentalmente en procesos inflamatorios en los cuales se observaba la movilización de los precursores de célula B a la periferia debido a la reducción de la expresión en médula ósea de la quimioquina CXCL12, dependiente de TNF α (Ueda et al., 2004). Como ya hemos comentado, durante la infección por *T. cruzi* detectamos en sangre esta citoquina (Sanoja et al., 2013) y observamos en bazo un importante incremento en el número de células B, con lo que podría estar ocurriendo linfopoyesis B extramedular en este órgano. Esto ya fue discutido en (Zuniga et al., 2005) pero los autores atribuyeron el incremento de células B en bazo a una activación clonal secundaria y no a linfopoyesis B extramedular, objetando que la frecuencia de células B inmaduras, dentro de las células B totales, disminuía con la infección. Sin embargo, los autores no hacen referencia al número total de células, y éste, a pesar de que los porcentajes disminuyan, podría estar aumentando a lo largo de la infección. En cualquier caso, un estudio más exhaustivo de los precursores de células B en bazo sería necesario para determinar con seguridad que este proceso de linfopoyesis B extramedular está ocurriendo. Dicho estudio se llevo a cabo en la infección por *T. brucei* donde se observó una clara inducción de la linfopoyesis B en bazo, con incremento de las poblaciones celulares HSC-LMPP, CLP, pre + pro B, pro B and pre B. Sin embargo en este modelo, la maduración final de las células B se vio truncada entre los estadios T1 y T2 (fases de maduración final de célula B en bazo) debido a apoptosis mediada por el contacto directo con el parásito (Bockstal et al., 2011). Se ha propuesto que una linfopoyesis B extramedular podría favorecer la generación de linfocitos B autoreactivos, debido a la incorrecta selección negativa, al no desarrollarse la célula B en el ambiente adecuado (Cain et al., 2009). En numerosos trabajos se ha descrito la generación de células B autoreactivas durante la infección por *T. cruzi* y se ha relacionado este fenómeno con el desarrollo de las patologías más graves de la enfermedad de Chagas (Teixeira et al., 2011).

Por último, durante la infección por *T. cruzi* también parece estar ocurriendo mielopoyesis extramedular, ya que se observa un importante incremento de células mieloides inmaduras en bazo. Sin embargo, no sabemos a partir de que precursores está ocurriendo este fenómeno ya que podría deberse a la movilización, desde médula ósea, de progenitores muy indiferenciados (como los CMPs), que continuarían su diferenciación en el bazo; o bien a la migración de las mismas células mieloides inmaduras que observamos, generadas en médula ósea. Mielopoyesis extramedular ha sido observada en multitud de procesos infecciosos como infección por *Leishmania major* (Mirkovich et al., 1986), malaria (Belyaev et al., 2013) e infección por *E. muris*

(MacNamara et al., 2010) y también se ha relacionado con la movilización de progenitores desde médula ósea dependiente de la señalización por IFN- γ (Belyaev et al., 2013; MacNamara et al., 2010). Durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* se detectan altas concentraciones de esta citoquina en circulación (Sanoja et al., 2013).

Observamos un incremento, tanto en la médula ósea como en el bazo, de la población monocítica CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high}. Un sesgo hacia el linaje monocítico también fue descrito en la infección por *Listeria* donde también ocurría disminución de los CMPs en médula ósea, como la que hemos descrito en este trabajo (Serbina et al., 2009). Por otro lado observamos un incremento de la población granulocítica CD11b^{pos} Ly6G^{pos} Ly6C^{low}, en bazo y en ganglio, hacia el final de la fase aguda de la infección. En los estudios de infección con *A. phagocytophilum* y *E. muris*, ya citados, los autores observaban un incremento en la población de células CD11b^{pos} Gr1^{pos} en médula ósea y en bazo (Johns et al., 2009; MacNamara et al., 2009) que asociaban a un aumento de la granulopoyesis, como la descrita en inflamación debida a tratamientos con LPS o en infecciones con *E. coli* (Quesenberry et al., 1972; Shahbazian et al., 2004). Sin embargo, la población CD11b^{pos} Gr1^{pos}, además de la población granulocítica CD11b^{pos} Ly6G^{pos} Ly6C^{low}, incluye a la población monocítica CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high}, y en esos trabajos no se distingue cual de las dos poblaciones se encuentra aumentada.

Estos marcadores son de células mieloides inmaduras pero también se utilizan para designar a las llamadas MDSCs, que son células mieloides inmaduras, que se encuentran también en un estado activado, y son capaces de suprimir la respuesta de las células T mediante mecanismos dependientes de la acción de las enzimas iNOS y Arg I, entre otros (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). En este trabajo hemos observado que se da la inducción de iNOS y de Arg I en médula ósea y en bazo durante la infección, que parece estar asociada a las células monocíticas CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{high} ya que coincide en el tiempo con la aparición de estas en ambos tejidos; y hemos determinado que estas células presentan características de MDSCs pues son capaces de suprimir la proliferación de los esplenocitos en respuesta a Con A. Es probable que estas MDSCs monocíticas se estén generando en médula ósea y en bazo durante la infección, y desde allí migren a tejidos afectados como el corazón, donde podrían estar ejerciendo su función supresora, permitiendo el asentamiento del parásito (Cuervo et al., 2011).

Por otro lado, las células mieloides granulocíticas CD11b^{pos} Ly6G^{pos} Ly6C^{low} no fueron capaces de suprimir la proliferación de los esplenocitos, al menos no en las condiciones ensayadas, lo cual sugiere que no son MDSCs. En (Arocena et al., 2013), sin embargo, los autores describen la presencia de MDSCs tanto monocíticas como granulocíticas durante la infección aguda por la cepa Tulahuen de *T. cruzi*; y atribuyen un papel importante a las MDSCs granulocíticas, en la

supresión de células T mediante la producción de ROS. En este mismo trabajo se propone que las MDSCs tienen un papel protector, como células reguladoras de una excesiva respuesta inflamatoria durante la infección por la cepa Tulahuen, más que un papel deletéreo inmunosupresor. Probablemente el que estas células sean beneficiosas o perjudiciales dependerá de qué causa más daños en cada modelo, si el parásito o la excesiva respuesta inflamatoria.

Por último, una característica común a todos los modelos citados es la esplenomegalia que, se ha propuesto, ocurre como consecuencia de la hematopoyesis extramedular en bazo, sobre todo eritropoyesis, sumada a una incapacidad del tejido de liberar las células a la circulación. Esto explicaría el por qué, paradójicamente, una hematopoyesis extramedular masiva suele ir acompañada de citopenias (MacNamara et al., 2009). En la infección por *T. cruzi* también se observa esplenomegalia y, al igual que en otros modelos (Jackson et al., 2010; MacNamara et al., 2009; Sohawon et al., 2012), hemos determinado que esta se debe, en gran medida, a un incremento en la eritropoyesis extramedular.

ALTERACIONES EN LA HEMATOPOYESIS DURANTE LA INFECCIÓN AGUDA POR *T. cruzi*: TIMO

El timo es un órgano que frecuentemente sufre involución aguda durante las infecciones. Esto, se cree que pueda ser ventajoso para evitar que la producción de nuevas células T durante una infección induzca posibles tolerancias frente a los antígenos de los patógenos, si estos llegan a alcanzar el timo (Dooley and Liston, 2012). Sin embargo, este fenómeno también se ha relacionado con posibles defectos en la inmunidad periférica y fenómenos de inmunosupresión durante infecciones (Savino et al., 2007).

La inducción de la atrofia de timo durante la infección aguda por *T. cruzi* ha sido uno de los modelos más utilizados para estudiar este proceso. Existen varios trabajos donde se trata de determinar cuales son las causas principales que provocan la casi total desaparición de los timocitos DP durante esta infección. Dos son las hipótesis que han sido más estudiadas:

- 1) La movilización de los timocitos DP a órganos periféricos, que se detectó al observar células T DP en órganos linfoides secundarios y se asoció a alteraciones en la expresión de ligandos y receptores de la matriz extracelular intratímica (Cotta-de-Almeida et al., 2003). Se ha propuesto que estas células podrían tener un papel en desórdenes autoinmunes, ya que podrían ser autoreactivas si han salido del timo antes de sufrir selección negativa (Parel and Chizzolini, 2004).
- 2) La muerte por apoptosis de los timocitos DP, que se ha relacionado con diversas causas como la actividad trans- sialidasa del parásito (Leguizamon et al., 1999; Mucci et al., 2002), el ATP

extracelular ([Mantuano-Barradas et al., 2003](#)) o la desregulación de la selección positiva debido a la excesiva producción de glucocorticoides ([Perez et al., 2007](#); [Roggero et al., 2006](#)). Este último mecanismo ocurre en otros procesos que comparten el estrés como factor común, ya que, en situaciones de estrés se estimula el eje hipotalámico-pituitario-adrenal y se producen grandes cantidades de glucocorticoides. Estos inducen la apoptosis de los timocitos DP de forma directa y también de forma indirecta mediante la reducción de la capacidad de señalización por el TCR, que genera un incremento en la muerte por desatención (muerte de los timocitos DP que no son seleccionados positivamente) ([Dooley and Liston, 2012](#)).

Para confirmar ambas hipótesis, en este trabajo hemos analizado tanto la presencia de células T DP en órganos periféricos como la apoptosis en timo, sin embargo, no hemos obtenido resultados que las apoyen.

En el primer caso, no observamos un incremento en la frecuencia de células T DP en ganglio y en bazo, como el descrito en ([Cotta-de-Almeida et al., 2003](#)). En nuestro modelo, los porcentajes de células T DP disminuyeron en ambos órganos, en la misma medida que disminuían las células T SP, aunque es cierto, que todas las poblaciones (incluidas las células T DP) aumentaron en número total de células de forma neta. En cualquier caso, esto no implica necesariamente que estas células T DP estén saliendo del timo ya que se ha descrito que, en determinadas situaciones de activación, las células T SP pueden adquirir en la periferia la expresión del otro receptor (CD4 ó CD8) ([Perez et al., 2012](#)).

En cuanto a la segunda hipótesis, a pesar de que detectamos un incremento en los niveles de glucocorticoides en plasma durante la infección, como se describió en ([Perez et al., 2007](#)), no observamos un incremento significativo de la apoptosis en timo, a diferencia de lo publicado en ([Mucci et al., 2002](#); [Perez et al., 2007](#)).

En otros modelos donde la disminución de los timocitos DP no correlacionó con un incremento de la apoptosis, la causa de la involución tímica se atribuyó a defectos en precursores tímicos previos ([Zoller and Kersh, 2006](#)). De un modo similar, en este trabajo observamos que los progenitores CLP (que incluyen precursores del linaje T) disminuyen durante la infección en médula ósea. También analizamos los diferentes estadios de timocitos DN: DN1, DN2, DN3 y DN4 y determinamos que existe una reducción significativa en el número de células de todas las poblaciones, que podría ser debida, en parte, a la reducción en el número de progenitores CLP de médula ósea. Sin embargo, también observamos una reducción muy intensa de la proporción de células en DN2, DN3 y DN4 (dentro de los timocitos DN totales) que prácticamente se hacen imperceptibles en comparación con los timocitos DN1. Con lo cual, a parte de una posible reducción en los precursores de célula T en médula ósea también parece estar ocurriendo un

bloqueo en la diferenciación de los timocitos DN en el timo entre los estadios DN1 y DN2. Algo similar fue observado previamente en tratamientos con poli(I:C) (molécula de RNA de doble cadena que mimetiza infección vírica) donde se detectó bloqueo entre las fases DN1 y DN2, reducción de la proliferación de timocitos DN3 y DN4 y disminución en la diversidad del TCR como resultado de una reducción en la expresión de las recombinasas TdT y Rag2 (Demoulins et al., 2008), y se relacionó con el reconocimiento de PAMPs a través del receptor MDA-5 y a los efectos del IFN α , pero no sobre los timocitos directamente, sino, probablemente, a través de las TECs (Anz et al., 2009). Se ha planteado que este mecanismo de involución tímica mediada por TECs, ocurre en situaciones de embarazo e infección, y resulta en un proceso de eliminación ordenado que da lugar a un timo con menor celularidad pero capaz de mantener una diferenciación tímica mínima (Dooley and Liston, 2012).

En nuestro modelo, parece que la señalización mediada por IL6 es importante para este proceso, ya que hemos observado que el bloqueo en la diferenciación de los timocitos DN no ocurre de forma tan exacerbada en los ratones deficientes para esta citoquina.

Se ha descrito inducción de la expresión de IL6 durante el proceso de involución tímica fetal, causado por exposición intra-amniótica a LPS, en un modelo ovino, y también se ha descrito expresión de IL6 durante la involución tímica asociada a vejez en humanos (Sempowski et al., 2000). En este último trabajo se observó que la administración externa de esta citoquina causaba atrofia de timo con pérdida de timocitos DP en ratón. También en la infección por *T. cruzi* se propuso que la citoquina IL6 podía tener un papel en la atrofia de timo causada pues se observó que los niveles de IL6 aumentaban en sangre en ratones KO para el receptor de TNF α , en los cuales la atrofia de timo era más pronunciada (Perez et al., 2007; Roggero et al., 2006).

Nosotros observamos que en los ratones IL6 KO la frecuencia de las distintas poblaciones, tanto de los timocitos DN como de los timocitos DP, no varía con la infección. El hecho de que la recuperación de la frecuencia de los timocitos DP correlacione con la recuperación de la frecuencia de los timocitos DN, sugiere que la desaparición de los timocitos DP es dependiente de la disminución de sus precursores, y no de mecanismos que afecten de forma específica a esta población (como la apoptosis directa mediada por glucocorticoides o la migración de estas células a la periferia). Se ha sugerido que la involución tímica debida a infecciones puede ser debida a un bloqueo en la diferenciación al nivel de los timocitos DN (como la que hemos descrito en este trabajo) pero que también puede ocurrir pérdida masiva de los timocitos DP por apoptosis mediada por glucocorticoides, en los casos de estrés debido a infección (Dooley and Liston, 2012). Nosotros detectamos un incremento en los niveles de glucocorticoides en plasma pero este no correlaciona con un aumento de la apoptosis en el timo.

Por otro lado, el número total de timocitos sí disminuyó con la infección por *T. cruzi*, en los ratones IL6 KO, aunque en menor medida que en los ratones BL6 WT. Esto sugiere que el proceso de involución tímica durante la infección por *T. cruzi* no depende exclusivamente de las variaciones en las proporciones celulares de las distintas poblaciones del timo, sino que también ocurre una disminución generalizada del número total de células de todas las poblaciones en la misma medida. Esta podría ser debida a la falta de precursores previos de médula ósea y/o a requerimientos de células T en la periferia que provoquen el vaciado del órgano de forma ordenada, manteniendo las proporciones de todas las poblaciones. Este proceso sería independiente de la señalización por IL6.

Por último, al igual que ocurría en médula ósea y en bazo, también observamos inducción de las enzimas iNOS y Arg I en timo durante la infección. Sin embargo, en esta ocasión no observamos la población de CD11b^{pos} Ly6G^{neg} Ly6C^{pos}, que veíamos en los otros tejidos. Por microscopía confocal de fluorescencia detectamos que las células que expresan iNOS y Arg I durante la infección son macrófagos CD68^{pos}. Encontramos macrófagos que expresan sólo iNOS, macrófagos que expresan sólo Arg I y macrófagos que expresan las dos enzimas al mismo tiempo. La expresión simultánea de iNOS y Arg I sólo se ha descrito en MDSCs (Gabrilovich and Nagaraj, 2009) aunque también podría darse en macrófagos M1 en transición hacia M2. Desconocemos si la presencia de estas células se debe a infiltración o a la inducción de la expresión de estas enzimas en macrófagos residentes en el timo.

Se ha descrito que la iNOS participa en la selección positiva en el timo mediante la protección de la apoptosis, mediada por glucocorticoides, de los timocitos cuyo TCR reconoce con alta afinidad el complejo MHC-péptido (Jeong et al., 2004). Tal vez la inducción que observamos de la enzima iNOS en timo (a través de su papel protector de la apoptosis mediada por glucocorticoides) sea el motivo por el cual, a pesar de que los niveles de glucocorticoides aumentan en circulación con la infección por *T. cruzi*, estos no causen ningún incremento de la apoptosis en timo.

Por otro lado, también se le ha atribuido a la iNOS un papel como inductor de la apoptosis de los timocitos cuyo TCR reconoce con demasiada afinidad el complejo MHC- péptido propio, durante la selección negativa (Tai et al., 1997). Nosotros analizamos la apoptosis y la expresión de la iNOS por microscopía de fluorescencia pero no observamos macrófagos CD68^{pos} iNOS^{pos} cerca de focos de células apoptóticas, como los descritos en (Fehsel et al., 1995), que puedan sugerirnos que estos estén involucrados en la inducción de la apoptosis (datos no mostrados). Por lo tanto, o la iNOS está ejerciendo un papel protector de la apoptosis de los timocitos durante la infección por *T. cruzi* o esta enzima no está involucrada en este proceso.

En cualquier caso, la iNOS no parece tener un papel muy determinante en la involución tímica durante la infección por *T. cruzi* ya que observamos que esta ocurre en la misma medida en los ratones tratados con un inhibidor específico de la iNOS.

PAPEL DEL METABOLISMO DE LA L-ARG DURANTE INFECCIÓN AGUDA POR *T. cruzi*

El aminoácido L-arg está considerado como semi-esencial o esencial condicional, ya que se requiere en la dieta en situaciones de estrés físico, en las cuales, los requerimientos del aminoácido exceden la capacidad productora del organismo (Popovic et al., 2007). Está involucrado en multitud de procesos metabólicos ya que sirve de precursor, no solo para la síntesis de proteínas, sino también para la síntesis de moléculas de gran relevancia biológica, como el NO, la urea, la prolina y las poliaminas (Wu and Morris, 1998). También es un sustrato metabólico esencial para células del sistema immune y se requiere para el funcionamiento adecuado de las células T (Drover et al., 2011).

Durante años se ha evaluado en numerosos ensayos clínicos el uso de L-arg como suplemento dietético para favorecer el sistema inmune, con resultados muy favorables en muchos casos (como en pacientes que iban a ser sometidos a cirugías de alto riesgo, donde se observó que un suplemento extra de L-arg ayudaba a prevenir infecciones) pero también con algunos resultados controvertidos, en pacientes críticamente enfermos o en casos de sepsis, donde el efecto de la L-arg no resultó tan claramente beneficioso. Por ello resulta importante identificar qué grupos de pacientes y/o enfermedades se beneficiarían de estas dietas con suplemento de L-arg (Drover et al., 2011). Existe un gran número de patologías en humanos (cáncer, tuberculosis, trauma, estrés post-quirúrgico) que se asocian a lo que se ha denominado síndrome de la deficiencia de L-arg (ADS). Éste se caracteriza por una serie de síntomas como la inducción patológica de la enzima Arg I [que generalmente se asocia a la expansión de MDSCs (Zhu et al., 2010), aunque también se ha descrito la liberación al medio extracelular de Arg I, procedente de hepatocitos sufriendo necrosis (Langle et al., 1997) o de eritrocitos durante la hemólisis (Morris et al., 2005)]; la disminución en la producción de NO (Wu et al., 1999) y defectos en la función de las células T debido, principalmente, a la pérdida de la expresión de la cadena ζ del CD3 (Rodriguez et al., 2002). Es en estos casos de deficiencia de L-arg en los que parece resultar beneficioso un aporte extra de este aminoácido en la dieta (Popovic et al., 2007).

En este trabajo hemos determinado que la infección por *T. cruzi* podría considerarse otra de las enfermedades asociadas a la deficiencia de L-arg, ya que en los ratones infectados por *T. cruzi* se reproducen todos los síntomas descritos asociados a este síndrome.

En primer lugar hemos observado una fuerte inducción de la expresión de Arg I durante la infección por *T. cruzi* en corazón, médula ósea, bazo y timo, que parece asociada a la acumulación de MDSCs monocíticas, al menos en los tres primeros tejidos. En (Cuervo et al., 2011), donde describimos la presencia de MDSCs en corazón durante la infección por *T. cruzi*, también observamos que los niveles de L-arg disminuían significativamente en plasma durante la infección, prolongándose esta depleción plasmática más tiempo en los ratones BALB/c, susceptibles a la infección, que en los ratones C57BL/6, resistentes a esta.

En este trabajo hemos podido confirmar que, efectivamente, la infección por *T. cruzi* causa un déficit de L-arg.

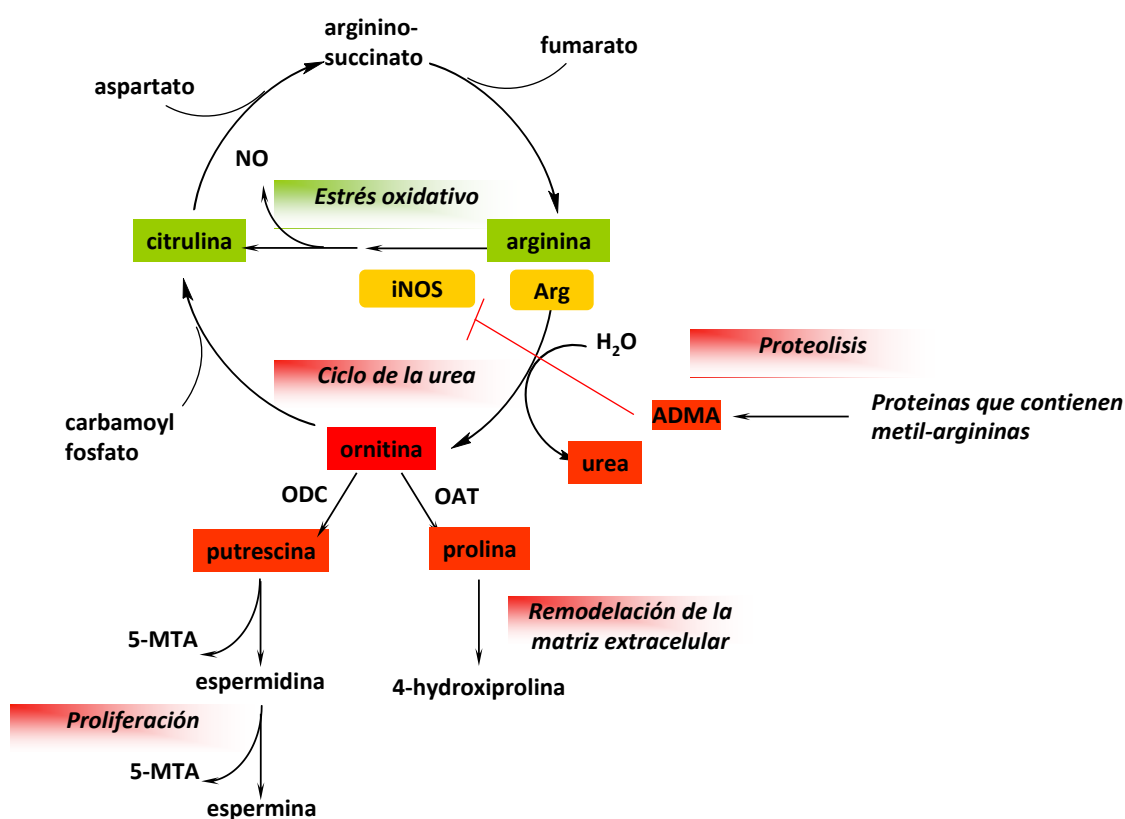


Figura D.1. Metabolismo de L-arg durante la infección por *T. cruzi*. En rojo se observan los metabolitos que aumentan durante la infección por *T. cruzi* y en verde los que disminuyen. Se muestran en rojo degradado los procesos celulares que, teniendo en cuenta los datos obtenidos, podrían estar viéndose inducidos y en verde degradado los que podrían estar viéndose reducidos, durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi*.

Observamos una disminución de este aminoácido, tanto en corazón como en plasma, que parece ser debida a una fuerte actividad Arg I, ya que los metabolitos derivados de la ruta de la Arg I (Urea, Ornitina, prolina y putrescina) aumentan durante la infección. Por otro lado, la disminución de este aminoácido y/o el incremento del inhibidor natural de la iNOS ADMA, parecen estar causando una reducción en la producción de NO, pues la citrulina, producto

derivado de la metabolización de L-arg a NO, disminuye significativamente en corazón durante la infección (Figura D.1).

Con idea de evaluar los efectos que este déficit de L-arg tiene en el desarrollo de la infección por *T. cruzi*, decidimos suplementar a los ratones con este aminoácido a lo largo de la infección. Determinamos que la L-arg parece crucial para resolver la fase aguda de la infección por *T. cruzi*, ya que los ratones suplementados con este aminoácido presentan menores cargas parasitarias, mejor *score* clínico y mayor tasa de supervivencia, que los ratones sin suplementar. Estos resultados sugieren que la infección por *T. cruzi* podría sumarse a la lista de procesos patológicos cuya resolución se ve favorecida con un suplemento extra de este aminoácido en la dieta.

Nos propusimos determinar el/los mecanismos mediante los cuales la L-arg podría estar ejerciendo sus efectos beneficiosos, durante la infección por *T. cruzi*.

Analizamos la expresión de la cadena ζ del CD3 a lo largo de la infección por *T. cruzi*, en ratones suplementados con L-arg y sin suplementar y observamos que, efectivamente, con la infección disminuye la expresión de esta proteína en extracto total de esplenocitos. Sin embargo, esta represión de la expresión de la cadena ζ no se revierte con el suplemento de L-arg. Se ha descrito represión de la cadena ζ del CD3 también por deficiencia de triptófano e incremento de metabolitos derivados de este aminoácido, como las kinureninas (Fallarino et al., 2006). En este trabajo hemos observado un fuerte incremento de kinurenina en plasma y extracto de tejido cardíaco con la infección, por lo que es posible, que este mecanismo esté involucrado en la represión de la expresión de la cadena ζ del CD3 y que, por ello, esta no se restaure con el suplemento de L-arg.

En cualquier caso, el hecho de que no se restaure la expresión de la cadena ζ del CD3 implica que éste no puede ser el mecanismo responsable de la mejora de la resistencia a la infección aguda por *T. cruzi* de los ratones suplementados con L-arg.

Por otro lado, la deficiencia de aminoácidos activa la kinasa GCN2 y reprime a la kinasa mTOR. Se ha descrito que estas kinasas están involucradas en la regulación, dependiente de factores nutricionales, de numerosos mecanismos relacionados con la respuesta inmune, como la inducción de Tregs (Sharma et al., 2007; Yurchenko et al., 2012), la inhibición de la diferenciación a Th17 (Delgoffe et al., 2009; Sundrud et al., 2009) o la inducción de anergia en células T por secuestro del ciclo celular (Rodriguez et al., 2007).

En este trabajo hemos analizado la fosforilación del factor de iniciación de la traducción eIF2 α , que se induce cuando se da activación de la kinasa GCN2 por tRNAs, pero no hemos obtenido resultados concluyentes. En cuanto a la activación de mTOR, vemos inducción de la fosforilación de P70s6K con la infección en todos los grupos de ratones, es posible que sea debido al efecto

de IFN γ (Kaur et al., 2007); y observamos que ésta podría estar viéndose favorecida por el suplemento de L-arg en extracto de esplenocitos, en algunos días post-infección. En cualquier caso, para obtener resultados concluyentes habría que purificar una población concreta, preferiblemente las células T, para evitar el efecto de los cambios en la frecuencia de las diferentes poblaciones celulares durante la infección, y hacer un seguimiento de la expresión de estos marcadores en un tipo celular concreto.

Por último analizamos los efectos del suplemento de L-arg en la producción de NO y observamos un incremento en la producción de NO₂, en extracto de corazón y en plasma, en los ratones suplementados con L-arg, con respecto a los ratones sin suplementar. Algo similar fue descrito en la infección por *T. brucei*, donde también se detectó disminución plasmática de L-Arg y se observó que la inyección intraperitoneal de L-arg incrementaba la capacidad tripanocida de los macrófagos peritoneales, ya que restauraba la producción de NO y disminuía la cantidad de parásitos en el peritoneo (Gobert et al., 2000). También nosotros determinamos *in vitro* que la producción de NO y la capacidad tripanocida de macrófagos Raw 264.7 en cultivo es dependiente de la disponibilidad de L-arg en el medio extracelular, como había sido descrito en (Norris et al., 1995). Y por último, confirmamos, *in vivo*, que los efectos beneficiosos del suplemento de L-arg, se ven truncados en ratones tratados con un inhibidor específico de la iNOS.

En resumen, la fase aguda de la infección por *T. cruzi* está asociada a un déficit de L-arg; el suplemento de L-arg favorece la resolución de la fase aguda de la infección por *T. cruzi*; y los efectos beneficiosos del aminoácido L-arg durante la infección por *T. cruzi* parecen dependientes de la producción de NO por parte de la iNOS.

CONCLUSIONES

1. Durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* se observa una supresión de la hematopoyesis en médula ósea caracterizada por hipoplasia de las poblaciones celulares: CMP, CLP, células pre + pro B, células B inmaduras, precursores de eritrocitos y células mieloides granulocíticas inmaduras.
2. La infección aguda por *T. cruzi* desencadena hematopoyesis extramedular en bazo, caracterizada por un incremento en la eritropoyesis y en la mielopoyesis en este órgano.
3. La atrofia tímica, durante la infección aguda por *T. cruzi*, no está asociada a la migración prematura de timocitos DP a órganos periféricos, como el bazo ó los ganglios subcutáneos, ni a un incremento de la apoptosis en timo durante la infección.
4. La atrofia tímica durante la infección por *T. cruzi* está asociada a la supresión de la timopoyesis a nivel de los timocitos DN debida, por un lado, a la posible falta de precursores tímicos de médula ósea y, por otro lado, a un bloqueo posterior en la maduración de los timocitos de DN1 a DN2. Este bloqueo depende de la señalización por la citoquina IL6, ya que no se observa en ratones genéticamente deficientes para esta citoquina.
5. Durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* tiene lugar una expansión de MDSCs monocíticas en médula ósea y en bazo.
6. Durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* se observa una disminución en la concentración de L-arg en plasma y corazón, que se asocia a un incremento en la actividad arginasa y a una disminución en la actividad NOS.
7. El suplemento de L-arg durante la infección revierte la disminución plasmática de este aminoácido, disminuye la carga parasitaria y aumenta la supervivencia de los ratones a la fase aguda de la infección por *T. cruzi*.
8. Durante la fase aguda de la infección por *T. cruzi* se observa disminución de la expresión de la cadena ζ del CD3 en esplenocitos, sin embargo, ésta no se recupera tras el suplemento de L-arg, por lo que los efectos beneficiosos del suplemento de L-arg no son debidos a la recuperación de la expresión de la cadena ζ del CD3.
9. El suplemento de L-arg durante la infección por *T. cruzi* incrementa la producción de NO *in vivo* y favorece la eliminación del parásito por macrófagos en cultivo *in vitro*. Los efectos beneficiosos del suplemento de la L-arg se ven contrarestados cuando se inhibe, simultáneamente, la actividad de la iNOS *in vivo*.

CONCLUSIONS

1. Haematopoiesis in bone marrow is suppressed during the acute phase of *T. cruzi* infection. This is characterized by hypoplasia of CMP, CLP, pre + pro B cells, immature B cells, erythrocytes precursors and granulocyte immature myeloid cell populations.
2. During the acute phase of *T. cruzi* infection splenic extramedullar haematopoiesis occurs. This is characterized by an increase of splenic erythropoiesis and myelopoiesis with infection.
3. Thymus atrophy during acute *T. cruzi* infection is not associated neither with premature migration of DP thymocytes to peripheral organs (such as the spleen or subcutaneous lymph nodes) nor with increased apoptosis in thymus during infection.
4. Thymus atrophy during *T. cruzi* infection is associated with suppression of thymopoiesis at DN thymocyte level. This suppression seems to be due to the decrease of thymic bone marrow precursors and also to a blockade of DN1 to DN2 thymocyte maturation stages. This DN thymocyte blockade depends on IL6 cytokine signalling, since it does not occur in IL6 knockout mice.
5. During acute *T. cruzi* infection there is an expansion of monocytic MDSCs in bone marrow and spleen.
6. L-arg depletion is observed in heart and plasma during *T. cruzi* infection, which is associated with an increase in arginase activity and a decrease in NOS derived NO production.
7. L-arg basal levels in plasma are restored by L-arg supplementation during *T. cruzi* infection. L-arg supplementation increases mice survival and decreases parasite burden during acute *T. cruzi* infection.
8. Acute *T. cruzi* infection causes repression of CD3 ζ chain expression in splenocytes. However, the CD3 ζ chain expression is not restored by L-arg supplementation, thus L-arg beneficial effects are unlikely due to the recovery of CD3 ζ chain protein expression.
9. L-arg supplementation during *T. cruzi* infection increases NO production *in vivo* and promotes parasite clearance by macrophages *in vitro*. The beneficial effects of L- arg supplementation are abrogated when iNOS activity is simultaneously inhibited *in vivo*.

REFERENCIAS

- Abrahamsohn I. A. and Coffman R. L. (1995) Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* **155**, 3955-63.
- Abrahamsohn I. A., da Silva A. P. and Coffman R. L. (2000) Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **68**, 1975-9.
- Alba Soto C. D., Mirkin G. A., Solana M. E. and Gonzalez Cappa S. M. (2003) *Trypanosoma cruzi* infection modulates in vivo expression of major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner. *Infect Immun* **71**, 1194-9.
- Aliberti J. C., Cardoso M. A., Martins G. A., Gazzinelli R. T., Vieira L. Q. and Silva J. S. (1996) Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun* **64**, 1961-7.
- Andrade L. O., Machado C. R., Chiari E., Pena S. D. and Macedo A. M. (2002) *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp Parasitol* **100**, 269-75.
- Antunez M. I. and Cardoni R. L. (2001) Early IFN-gamma production is related to the presence of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Immunol Lett* **79**, 189-96.
- Anz D., Thaler R., Stephan N., Waibler Z., Trauscheid M. J., Scholz C., Kalinke U., Barchet W., Endres S. and Bourquin C. (2009) Activation of melanoma differentiation-associated gene 5 causes rapid involution of the thymus. *J Immunol* **182**, 6044-50.
- Arocena A. R., Onofrio L. I., Pellegrini A. V., Carrera Silva A. E., Paroli A., Cano R. C., Aoki M. P. and Gea S. (2013) Myeloid-derived suppressor cells are key players in the resolution of inflammation during a model of acute infection. *Eur J Immunol* **44**, 184-94.
- Baldrige M. T., King K. Y., Boles N. C., Weksberg D. C. and Goodell M. A. (2010) Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN-gamma in response to chronic infection. *Nature* **465**, 793-7.
- Baldrige M. T., King K. Y. and Goodell M. A. (2011) Inflammatory signals regulate hematopoietic stem cells. *Trends Immunol* **32**, 57-65.
- Barbul A. (1990) Arginine and immune function. *Nutrition* **6**, 53-8; discussion 59-62.
- Beltowski J. and Kedra A. (2006) Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a target for pharmacotherapy. *Pharmacol Rep* **58**, 159-78.
- Belyaev N. N., Biro J., Langhorne J. and Potocnik A. J. (2013) Extramedullary myelopoiesis in malaria depends on mobilization of myeloid-restricted progenitors by IFN-gamma induced chemokines. *PLoS Pathog* **9**, e1003406.
- Bhandoola A., von Boehmer H., Petrie H. T. and Zuniga-Pflucker J. C. (2007) Commitment and developmental potential of extrathymic and intrathymic T cell precursors: plenty to choose from. *Immunity* **26**, 678-89.
- Bockstal V., Guirnalda P., Caljon G., Goenka R., Telfer J. C., Frenkel D., Radwanska M., Magez S. and Black S. J. (2011) *T. brucei* infection reduces B lymphopoiesis in bone marrow and truncates compensatory splenic lymphopoiesis through transitional B-cell apoptosis. *PLoS Pathog* **7**, e1002089.
- Boiko J. R. and Borghesi L. (2012) Hematopoiesis sculpted by pathogens: Toll-like receptors and inflammatory mediators directly activate stem cells. *Cytokine* **57**, 1-8.
- Borrow P., Hou S., Gloster S., Ashton M. and Hyland L. (2005) Virus infection-associated bone marrow B cell depletion and impairment of humoral immunity to heterologous infection mediated by TNF-alpha/LTalpha. *Eur J Immunol* **35**, 524-32.
- Bronte V., Serafini P., De Santo C., Marigo I., Tosello V., Mazzoni A., Segal D. M., Staib C., Lowel M., Sutter G., Colombo M. P. and Zanovello P. (2003) IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* **170**, 270-8.
- Bronte V. and Zanovello P. (2005) Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* **5**, 641-54.

- Bryan M. A., Guyach S. E. and Norris K. A. (2010) Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. *PLoS Negl Trop Dis* **4**, e733.
- Brys L., Beschin A., Raes G., Ghassabeh G. H., Noel W., Brandt J., Brombacher F. and De Baetselier P. (2005) Reactive oxygen species and 12/15-lipoxygenase contribute to the antiproliferative capacity of alternatively activated myeloid cells elicited during helminth infection. *J Immunol* **174**, 6095-104.
- Cain D., Kondo M., Chen H. and Kelsoe G. (2009) Effects of acute and chronic inflammation on B-cell development and differentiation. *J Invest Dermatol* **129**, 266-77.
- Cardillo F., Voltarelli J. C., Reed S. G. and Silva J. S. (1996) Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun* **64**, 128-34.
- Cardoso J. E. and Brener Z. (1980) Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **75**, 97-104.
- Ceredig R. and Rolink T. (2002) A positive look at double-negative thymocytes. *Nat Rev Immunol* **2**, 888-97.
- Cotta-de-Almeida V., Bonomo A., Mendes-da-Cruz D. A., Riederer I., De Meis J., Lima-Quaresma K. R., Vieira-de-Abreu A., Villa-Verde D. M. and Savino W. (2003) *Trypanosoma cruzi* infection modulates intrathymic contents of extracellular matrix ligands and receptors and alters thymocyte migration. *Eur J Immunol* **33**, 2439-48.
- Cotterell S. E., Engwerda C. R. and Kaye P. M. (2000) *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. *Blood* **95**, 1642-51.
- Cuervo H., Guerrero N. A., Carbajosa S., Beschin A., De Baetselier P., Girones N. and Fresno M. (2011) Myeloid-derived suppressor cells infiltrate the heart in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* **187**, 2656-65.
- Cunha-Neto E., Teixeira P. C., Nogueira L. G. and Kalil J. (2011) Autoimmunity. *Adv Parasitol* **76**, 129-52.
- Chagas C. (1909a) Neue Trypanosomen. . *Archiv für schiffs- und tropen-hygiene* **13**, 120-122.
- Chagas C. (1909b) Nova tripanosomíaze humana. *Mem. Inst.Oswaldo Cruz* **1**, 3-62.
- Daghigh F., Fukuto J. M. and Ash D. E. (1994) Inhibition of rat liver arginase by an intermediate in NO biosynthesis, NG-hydroxy-L-arginine: implications for the regulation of nitric oxide biosynthesis by arginase. *Biochem Biophys Res Commun* **202**, 174-80.
- Davis B. R. and Zauli G. (1995) Effect of human immunodeficiency virus infection on haematopoiesis. *Baillieres Clin Haematol* **8**, 113-30.
- de Meis J., Morrot A., Farias-de-Oliveira D. A., Villa-Verde D. M. and Savino W. (2009) Differential regional immune response in Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* **3**, e417.
- del Puerto F., Nishizawa J. E., Kikuchi M., Roca Y., Avilas C., Gianella A., Lora J., Velarde F. U., Miura S., Komiya N., Maemura K. and Hirayama K. (2012) Protective human leucocyte antigen haplotype, HLA-DRB1*01-B*14, against chronic Chagas disease in Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1587.
- Delgoffe G. M., Kole T. P., Zheng Y., Zarek P. E., Matthews K. L., Xiao B., Worley P. F., Kozma S. C. and Powell J. D. (2009) The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity* **30**, 832-44.
- Demoulins T., Abdallah A., Kettaf N., Baron M. L., Gerarduzzi C., Gauchat D., Gratton S. and Sekaly R. P. (2008) Reversible blockade of thymic output: an inherent part of TLR ligand-mediated immune response. *J Immunol* **181**, 6757-69.
- Dooley J. and Liston A. (2012) Molecular control over thymic involution: from cytokines and microRNA to aging and adipose tissue. *Eur J Immunol* **42**, 1073-9.

- Drover J. W., Dhaliwal R., Weitzel L., Wischmeyer P. E., Ochoa J. B. and Heyland D. K. (2011) Perioperative use of arginine-supplemented diets: a systematic review of the evidence. *J Am Coll Surg* **212**, 385-99, 399 e1.
- Essers M. A., Offner S., Blanco-Bose W. E., Waibler Z., Kalinke U., Duchosal M. A. and Trumpp A. (2009) IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* **458**, 904-8.
- Fehsel K., Kroncke K. D., Meyer K. L., Huber H., Wahn V. and Kolb-Bachofen V. (1995) Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J Immunol* **155**, 2858-65.
- Fischer T. A., Palmethofer A., Gambaryan S., Butt E., Jassoy C., Walter U., Sopper S. and Lohmann S. M. (2001) Activation of cGMP-dependent protein kinase I β inhibits interleukin 2 release and proliferation of T cell receptor-stimulated human peripheral T cells. *J Biol Chem* **276**, 5967-74.
- Gabrilovich D. I. and Nagaraj S. (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* **9**, 162-74.
- Garg N., Nunes M. P. and Tarleton R. L. (1997) Delivery by *Trypanosoma cruzi* of proteins into the MHC class I antigen processing and presentation pathway. *J Immunol* **158**, 3293-302.
- Gascon J., Bern C. and Pinazo M. J. (2009) Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop* **115**, 22-7.
- Gazzinelli R. T., Oswald I. P., Hieny S., James S. L. and Sher A. (1992) The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol* **22**, 2501-6.
- Girones N., Cuervo H. and Fresno M. (2005) *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **296**, 89-123.
- Girones N. and Fresno M. (2003) Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol* **19**, 19-22.
- Gobert A. P., Daulouede S., Lepoivre M., Boucher J. L., Bouteille B., Buguet A., Cespuglio R., Veyret B. and Vincendeau P. (2000) L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infect Immun* **68**, 4653-7.
- Gobert A. P., McGee D. J., Akhtar M., Mendz G. L., Newton J. C., Cheng Y., Mobley H. L. and Wilson K. T. (2001) *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13844-9.
- Goni O., Alcaide P. and Fresno M. (2002) Immunosuppression during acute *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells. *Int Immunol* **14**, 1125-34.
- Graefe S. E., Jacobs T., Gaworski I., Klauenberg U., Steeg C. and Fleischer B. (2003) Interleukin-12 but not interleukin-18 is required for immunity to *Trypanosoma cruzi* in mice. *Microbes Infect* **5**, 833-9.
- Griesemer A. D., Sorenson E. C. and Hardy M. A. (2010) The role of the thymus in tolerance. *Transplantation* **90**, 465-74.
- Guhl F., Jaramillo C., Vallejo G. A., Yockteng R., Cardenas-Arroyo F., Fornaciari G., Arriaza B. and Aufderheide A. C. (1999) Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Am J Phys Anthropol* **108**, 401-7.
- Gutierrez F. R., Mineo T. W., Pavanelli W. R., Guedes P. M. and Silva J. S. (2009) The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104 Suppl 1**, 236-45.
- Hermesh T., Moltedo B., Moran T. M. and Lopez C. B. (2010) Antiviral instruction of bone marrow leukocytes during respiratory viral infections. *Cell Host Microbe* **7**, 343-53.
- Huang S., Hendriks W., Althage A., Hemmi S., Bluethmann H., Kamijo R., Vilcek J., Zinkernagel R. M. and Aguet M. (1993) Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* **259**, 1742-5.

- Hunter C. A., Ellis-Neyes L. A., Slifer T., Kanaly S., Grunig G., Fort M., Rennick D. and Araujo F. G. (1997) IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* **158**, 3311-6.
- Hwang J. H., Kim S. W., Lee H. J., Yun H. J., Kim S. and Jo D. Y. (2006) Interferon gamma has dual potential in inhibiting or promoting survival and growth of hematopoietic progenitors: interactions with stromal cell-derived factor 1. *Int J Hematol* **84**, 143-50.
- Ikede B. O., Lule M. and Terry R. J. (1977) Anaemia in trypanosomiasis: mechanisms of erythrocyte destruction in mice infected with *Trypanosoma congolense* or *T. brucei*. *Acta Trop* **34**, 53-60.
- Jackson A., Nanton M. R., O'Donnell H., Akue A. D. and McSorley S. J. (2010) Innate immune activation during *Salmonella* infection initiates extramedullary erythropoiesis and splenomegaly. *J Immunol* **185**, 6198-204.
- Jacobsen F. W., Rothe M., Rusten L., Goeddel D. V., Smeland E. B., Veiby O. P., Slordal L. and Jacobsen S. E. (1994) Role of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor: inhibition of early hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10695-9.
- Jeong S. M., Lee K. Y., Shin D., Chung H., Jeon S. H. and Seong R. H. (2004) Nitric oxide inhibits glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes by repressing the SRG3 expression. *J Biol Chem* **279**, 34373-9.
- Johns J. L., Macnamara K. C., Walker N. J., Winslow G. M. and Borjesson D. L. (2009) Infection with *Anaplasma phagocytophilum* induces multilineage alterations in hematopoietic progenitor cells and peripheral blood cells. *Infect Immun* **77**, 4070-80.
- Kaur S., Lal L., Sassano A., Majchrzak-Kita B., Srikanth M., Baker D. P., Petroulakis E., Hay N., Sonenberg N., Fish E. N. and Platanias L. C. (2007) Regulatory effects of mammalian target of rapamycin-activated pathways in type I and II interferon signaling. *J Biol Chem* **282**, 1757-68.
- Kawamoto H. and Katsura Y. (2009) A new paradigm for hematopoietic cell lineages: revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy. *Trends Immunol* **30**, 193-200.
- Kierszenbaum F. (2005) Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *Trends Parasitol* **21**, 513-6.
- Kim C. H. (2010) Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. *J Blood Med* **1**, 13-9.
- King K. Y. and Goodell M. A. (2011) Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. *Nat Rev Immunol* **11**, 685-92.
- Kishimoto H., Surh C. D. and Sprent J. (1998) A role for Fas in negative selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* **187**, 1427-38.
- Knubel C. P., Martinez F. F., Fretes R. E., Diaz Lujan C., Theumer M. G., Cervi L. and Motran C. C. (2010) Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J* **24**, 2689-701.
- Konig T., Bogdan C. and Schleicher U. (2009) Translational repression of inducible NO synthase in macrophages by l-arginine depletion is not associated with an increased phosphorylation of eIF2alpha. *Immunobiology* **214**, 822-7.
- Kumar S. and Tarleton R. L. (1998) The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol* **20**, 207-16.
- Kusmartsev S. and Gabrilovich D. I. (2005) STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol* **174**, 4880-91.
- Kuypers E., Wolfs T. G., Collins J. J., Jellema R. K., Newnham J. P., Kemp M. W., Kallapur S. G., Jobe A. H. and Kramer B. W. (2013) Intraamniotic lipopolysaccharide exposure changes cell populations and structure of the ovine fetal thymus. *Reprod Sci* **20**, 946-56.
- Langle F., Steininger R., Waldmann E., Grunberger T., Benditte H., Mittlböck M., Soliman T., Schindl M., Windberger U., Mühlbacher F. and Roth E. (1997) Improvement of cardiac output and liver blood flow and reduction of pulmonary vascular resistance by

- intravenous infusion of L-arginine during the early reperfusion period in pig liver transplantation. *Transplantation* **63**, 1225-33.
- Leguizamon M. S., Mocetti E., Garcia Rivello H., Argibay P. and Campetella O. (1999) Transsialidase from *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in cells from the immune system in vivo. *J Infect Dis* **180**, 1398-402.
- Levin M. J. (1996) In chronic Chagas heart disease, don't forget the parasite. *Parasitol Today* **12**, 415-6.
- Lewis M. D., Ma J., Yeo M., Carrasco H. J., Llewellyn M. S. and Miles M. A. (2009) Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *Am J Trop Med Hyg* **81**, 1041-9.
- Lozano R., Naghavi M., Foreman K., Lim S., Shibuya K., Aboyans V., Abraham J., Adair T., Aggarwal R., Ahn S. Y., Alvarado M., Anderson H. R., Anderson L. M., Andrews K. G., Atkinson C., Baddour L. M., Barker-Collo S., Bartels D. H., Bell M. L., Benjamin E. J., Bennett D., Bhalla K., Bikbov B., Bin Abdulhak A., Birbeck G., Blyth F., Bolliger I., Boufous S., Bucello C., Burch M., Burney P., Carapetis J., Chen H., Chou D., Chugh S. S., Coffeng L. E., Colan S. D., Colquhoun S., Colson K. E., Condon J., Connor M. D., Cooper L. T., Corriere M., Cortinovis M., de Vaccaro K. C., Couser W., Cowie B. C., Criqui M. H., Cross M., Dabhadkar K. C., Dahodwala N., De Leo D., Degenhardt L., Delossantos A., Denenberg J., Des Jarlais D. C., Dharmaratne S. D., Dorsey E. R., Driscoll T., Duber H., Ebel B., Erwin P. J., Espindola P., Ezzati M., Feigin V., Flaxman A. D., Forouzanfar M. H., Fowkes F. G., Franklin R., Fransen M., Freeman M. K., Gabriel S. E., Gakidou E., Gaspari F., Gillum R. F., Gonzalez-Medina D., Halasa Y. A., Haring D., Harrison J. E., Havmoeller R., Hay R. J., Hoen B., Hotez P. J., Hoy D., Jacobsen K. H., James S. L., Jasrasaria R., Jayaraman S., Johns N., Karthikeyan G., Kassebaum N., Keren A., Khoo J. P., Knowlton L. M., Kobusingye O., Koranteng A., Krishnamurthi R., Lipnick M., Lipshultz S. E., Ohno S. L., et al. (2012) Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* **380**, 2095-128.
- Mabbott N. and Sternberg J. (1995) Bone marrow nitric oxide production and development of anemia in *Trypanosoma brucei*-infected mice. *Infect Immun* **63**, 1563-6.
- Maciejewski J. P., Selleri C., Sato T., Cho H. J., Keefer L. K., Nathan C. F. and Young N. S. (1995) Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. Contribution to inhibitory action of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* **96**, 1085-92.
- MacNamara K. C., Oduro K., Martin O., Jones D. D., McLaughlin M., Choi K., Borjesson D. L. and Winslow G. M. (2010) Infection-induced myelopoiesis during intracellular bacterial infection is critically dependent upon IFN-gamma signaling. *J Immunol* **186**, 1032-43.
- MacNamara K. C., Racine R., Chatterjee M., Borjesson D. and Winslow G. M. (2009) Diminished hematopoietic activity associated with alterations in innate and adaptive immunity in a mouse model of human monocytic ehrlichiosis. *Infect Immun* **77**, 4061-9.
- Machado F. S., Dutra W. O., Esper L., Gollob K. J., Teixeira M. M., Factor S. M., Weiss L. M., Nagajyothi F., Tanowitz H. B. and Garg N. J. (2012) Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol* **34**, 753-70.
- Majumder S. and Kierszenbaum F. (1996) Mechanisms of *Trypanosoma cruzi*-induced down-regulation of lymphocyte function. Inhibition of transcription and expression of IL-2 receptor gamma (p64IL-2R) and beta (p70IL-2R) chain molecules in activated normal human lymphocytes. *J Immunol* **156**, 3866-74.
- Malvezi A. D., Cecchini R., de Souza F., Tadokoro C. E., Rizzo L. V. and Pinge-Filho P. (2004) Involvement of nitric oxide (NO) and TNF-alpha in the oxidative stress associated with anemia in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **41**, 69-77.

- Mantuano-Barradas M., Henriques-Pons A., Araujo-Jorge T. C., Di Virgilio F., Coutinho-Silva R. and Persechini P. M. (2003) Extracellular ATP induces cell death in CD4+/CD8+ double-positive thymocytes in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect* **5**, 1363-71.
- Marcondes M. C., Borelli P., Yoshida N. and Russo M. (2000) Acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with anemia, thrombocytopenia, leukopenia, and bone marrow hypoplasia: reversal by nifurtimox treatment. *Microbes Infect* **2**, 347-52.
- Martin D. and Tarleton R. (2004) Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Rev* **201**, 304-17.
- Mendes-da-Cruz D. A., Silva J. S., Cotta-de-Almeida V. and Savino W. (2006) Altered thymocyte migration during experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection: combined role of fibronectin and the chemokines CXCL12 and CCL4. *Eur J Immunol* **36**, 1486-93.
- Michelin M. A., Silva J. S. and Cunha F. Q. (2005) Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol* **111**, 71-9.
- Mirkovich A. M., Galelli A., Allison A. C. and Modabber F. Z. (1986) Increased myelopoiesis during *Leishmania major* infection in mice: generation of 'safe targets', a possible way to evade the effector immune mechanism. *Clin Exp Immunol* **64**, 1-7.
- Moncayo A. and Silveira A. C. (2009) Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **104 Suppl 1**, 17-30.
- Mori T., Ando K., Tanaka K., Ikeda Y. and Koga Y. (1997) Fas-mediated apoptosis of the hematopoietic progenitor cells in mice infected with murine cytomegalovirus. *Blood* **89**, 3565-73.
- Morrot A., Barreto de Albuquerque J., Berbert L. R., de Carvalho Pinto C. E., de Meis J. and Savino W. (2012) Dynamics of Lymphocyte Populations during *Trypanosoma cruzi* Infection: From Thymocyte Depletion to Differential Cell Expansion/Contraction in Peripheral Lymphoid Organs. *J Trop Med* **2012**, 747185.
- Mossner J., Hammermann R. and Racke K. (2001) Concomitant down-regulation of L-arginine transport and nitric oxide (NO) synthesis in rat alveolar macrophages by the polyamine spermine. *Pulm Pharmacol Ther* **14**, 297-305.
- Mucci J., Hidalgo A., Mocetti E., Argibay P. F., Leguizamon M. S. and Campetella O. (2002) Thymocyte depletion in *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by trans-sialidase-induced apoptosis on nurse cells complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3896-901.
- Muller U., Sobek V., Balkow S., Holscher C., Mullbacher A., Museteanu C., Mossmann H. and Simon M. M. (2003) Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway. *Eur J Immunol* **33**, 70-8.
- Munoz-Fernandez M. A., Fernandez M. A. and Fresno M. (1992) Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol* **22**, 301-7.
- Norris K. A., Schrimpf J. E., Flynn J. L. and Morris S. M., Jr. (1995) Enhancement of macrophage microbicidal activity: supplemental arginine and citrulline augment nitric oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun* **63**, 2793-6.
- Orkin S. H. and Zon L. I. (2008) Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* **132**, 631-44.
- Parel Y. and Chizzolini C. (2004) CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease. *Autoimmun Rev* **3**, 215-20.

- Paulson R. F., Shi L. and Wu D. C. (2011) Stress erythropoiesis: new signals and new stress progenitor cells. *Curr Opin Hematol* **18**, 139-45.
- Pegg A. E. (2006) Regulation of ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* **281**, 14529-32.
- Perez A. R., Morrot A., Berbert L. R., Terra-Granado E. and Savino W. (2012) Extrathymic CD4+CD8+ lymphocytes in Chagas disease: possible relationship with an immunoendocrine imbalance. *Ann N Y Acad Sci* **1262**, 27-36.
- Perez A. R., Roggero E., Nicora A., Palazzi J., Besedovsky H. O., Del Rey A. and Bottasso O. A. (2007) Thymus atrophy during *Trypanosoma cruzi* infection is caused by an immunoendocrine imbalance. *Brain Behav Immun* **21**, 890-900.
- Petryniak J., Huard T. K., Nordblom G. D. and Goldstein I. J. (1986) Lectin binding studies on murine peritoneal cells: physicochemical characterization of the binding of lectins from *Datura stramonium*, *Evonymus europaea*, and *Griffonia simplicifolia* to murine peritoneal cells. *Arch Biochem Biophys* **244**, 57-66.
- Piron M., Fisa R., Casamitjana N., Lopez-Chejade P., Puig L., Verges M., Gascon J., Gomez i Prat J., Portus M. and Sauleda S. (2007) Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop* **103**, 195-200.
- Popovic P. J., Zeh H. J., 3rd and Ochoa J. B. (2007) Arginine and immunity. *J Nutr* **137**, 1681S-1686S.
- Porritt H. E., Rumpf L. L., Tabrizifard S., Schmitt T. M., Zuniga-Pflucker J. C. and Petrie H. T. (2004) Heterogeneity among DN1 prothymocytes reveals multiple progenitors with different capacities to generate T cell and non-T cell lineages. *Immunity* **20**, 735-45.
- Quesenberry P., Morley A., Stohlman F., Jr., Rickard K., Howard D. and Smith M. (1972) Effect of endotoxin on granulopoiesis and colony-stimulating factor. *N Engl J Med* **286**, 227-32.
- Rassi A., Jr., Rassi A. and Marcondes de Rezende J. (2012) American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am* **26**, 275-91.
- Rassi A., Jr., Rassi A. and Marin-Neto J. A. (2010) Chagas disease. *Lancet* **375**, 1388-402.
- Rebel V. I., Hartnett S., Hill G. R., Lazo-Kallanian S. B., Ferrara J. L. and Sieff C. A. (1999) Essential role for the p55 tumor necrosis factor receptor in regulating hematopoiesis at a stem cell level. *J Exp Med* **190**, 1493-504.
- Rezzoug F., Huang Y., Tanner M. K., Wysoczynski M., Schanie C. L., Chilton P. M., Ratajczak M. Z., Fugier-Vivier I. J. and Ildstad S. T. (2008) TNF-alpha is critical to facilitate hemopoietic stem cell engraftment and function. *J Immunol* **180**, 49-57.
- Rodriguez P. C., Quiceno D. G. and Ochoa A. C. (2007) L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* **109**, 1568-73.
- Rodriguez P. C., Quiceno D. G., Zabaleta J., Ortiz B., Zea A. H., Piazuolo M. B., Delgado A., Correa P., Brayer J., Sotomayor E. M., Antonia S., Ochoa J. B. and Ochoa A. C. (2004) Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Res* **64**, 5839-49.
- Rodriguez P. C., Zea A. H., Culotta K. S., Zabaleta J., Ochoa J. B. and Ochoa A. C. (2002) Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J Biol Chem* **277**, 21123-9.
- Rodriguez S., Chora A., Goumnerov B., Mumaw C., Goebel W. S., Fernandez L., Baydoun H., HogenEsch H., Dombkowski D. M., Karlewicz C. A., Rice S., Rahme L. G. and Carlesso N. (2009) Dysfunctional expansion of hematopoietic stem cells and block of myeloid differentiation in lethal sepsis. *Blood* **114**, 4064-76.
- Roggero E., Perez A. R., Tamae-Kakazu M., Piazzon I., Nepomnaschy I., Besedovsky H. O., Bottasso O. A. and del Rey A. (2006) Endogenous glucocorticoids cause thymus atrophy but are protective during acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Endocrinol* **190**, 495-503.
- Rosenfeld S. J. and Young N. S. (1991) Viruses and bone marrow failure. *Blood Rev* **5**, 71-7.
- Sanoja C., Carbajosa S., Fresno M. and Girones N. (2013) Analysis of the dynamics of infiltrating CD4(+) T cell subsets in the heart during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS One* **8**, e65820.

- Savino W., Dardenne M., Velloso L. A. and Dayse Silva-Barbosa S. (2007) The thymus is a common target in malnutrition and infection. *Br J Nutr* **98 Suppl 1**, S11-6.
- Scumpia P. O., Kelly-Scumpia K. M., Delano M. J., Weinstein J. S., Cuenca A. G., Al-Quran S., Bovio I., Akira S., Kumagai Y. and Moldawer L. L. (2010) Cutting edge: bacterial infection induces hematopoietic stem and progenitor cell expansion in the absence of TLR signaling. *J Immunol* **184**, 2247-51.
- Schmittgen T. D. and Livak K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**, 1101-8.
- Schmunis G. A. (2007) Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **102 Suppl 1**, 75-85.
- Sedger L. M., Hou S., Osvath S. R., Glaccum M. B., Peschon J. J., van Rooijen N. and Hyland L. (2002) Bone marrow B cell apoptosis during in vivo influenza virus infection requires TNF-alpha and lymphotoxin-alpha. *J Immunol* **169**, 6193-201.
- Seita J. and Weissman I. L. (2010) Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* **2**, 640-53.
- Selleri C., Sato T., Anderson S., Young N. S. and Maciejewski J. P. (1995) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha suppress both early and late stages of hematopoiesis and induce programmed cell death. *J Cell Physiol* **165**, 538-46.
- Sempowski G. D., Hale L. P., Sundry J. S., Massey J. M., Koup R. A., Douek D. C., Patel D. D. and Haynes B. F. (2000) Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy. *J Immunol* **164**, 2180-7.
- Serbina N. V., Hohl T. M., Cherny M. and Pamer E. G. (2009) Selective expansion of the monocytic lineage directed by bacterial infection. *J Immunol* **183**, 1900-10.
- Shahbazian L. M., Quinton L. J., Bagby G. J., Nelson S., Wang G. and Zhang P. (2004) Escherichia coli pneumonia enhances granulopoiesis and the mobilization of myeloid progenitor cells into the systemic circulation. *Crit Care Med* **32**, 1740-6.
- Sharma M. D., Baban B., Chandler P., Hou D. Y., Singh N., Yagita H., Azuma M., Blazar B. R., Mellor A. L. and Munn D. H. (2007) Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* **117**, 2570-82.
- Silva J. S., Machado F. S. and Martins G. A. (2003) The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front Biosci* **8**, s314-25.
- Silva J. S., Vespa G. N., Cardoso M. A., Aliberti J. C. and Cunha F. Q. (1995) Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to Trypanosoma cruzi infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun* **63**, 4862-7.
- Simmons P., Kaushansky K. and Torok-Storb B. (1990) Mechanisms of cytomegalovirus-mediated myelosuppression: perturbation of stromal cell function versus direct infection of myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1386-90.
- Singh P., Yao Y., Weliver A., Broxmeyer H. E., Hong S. C. and Chang C. H. (2008) Vaccinia virus infection modulates the hematopoietic cell compartments in the bone marrow. *Stem Cells* **26**, 1009-16.
- Soares M. B., Pontes-De-Carvalho L. and Ribeiro-Dos-Santos R. (2001) The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc* **73**, 547-59.
- Sohawon D., Lau K. K., Lau T. and Bowden D. K. (2012) Extra-medullary haematopoiesis: a pictorial review of its typical and atypical locations. *J Med Imaging Radiat Oncol* **56**, 538-44.
- Sprent J. and Kishimoto H. (2002) The thymus and negative selection. *Immunol Rev* **185**, 126-35.

- Starr T. K., Jameson S. C. and Hogquist K. A. (2003) Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* **21**, 139-76.
- Stijlemans B., Vankrunkelsven A., Brys L., Raes G., Magez S. and De Baetselier P. (2010) Scrutinizing the mechanisms underlying the induction of anemia of inflammation through GPI-mediated modulation of macrophage activation in a model of African trypanosomiasis. *Microbes Infect* **12**, 389-99.
- Szondy Z., Garabuczi E., Toth K., Kiss B. and Koroskenyi K. (2012) Thymocyte death by neglect: contribution of engulfing macrophages. *Eur J Immunol* **42**, 1662-7.
- Taghon T., Yui M. A., Pant R., Diamond R. A. and Rothenberg E. V. (2006) Developmental and molecular characterization of emerging beta- and gammadelta-selected pre-T cells in the adult mouse thymus. *Immunity* **24**, 53-64.
- Tai X. G., Toyo-oka K., Yamamoto N., Yashiro Y., Mu J., Hamaoka T. and Fujiwara H. (1997) Expression of an inducible type of nitric oxide (NO) synthase in the thymus and involvement of NO in deletion of TCR-stimulated double-positive thymocytes. *J Immunol* **158**, 4696-703.
- Tarleton R. L. (2001) Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol* **31**, 550-4.
- Teixeira A. R., Hecht M. M., Guimaro M. C., Sousa A. O. and Nitz N. (2011) Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin Microbiol Rev* **24**, 592-630.
- Torrico F., Heremans H., Rivera M. T., Van Marck E., Billiau A. and Carlier Y. (1991) Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol* **146**, 3626-32.
- Ueda Y., Yang K., Foster S. J., Kondo M. and Kelsoe G. (2004) Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J Exp Med* **199**, 47-58.
- Venturini G., Salvati L., Muolo M., Colasanti M., Gradoni L. and Ascenzi P. (2000) Nitric oxide inhibits cruzipain, the major papain-like cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun* **270**, 437-41.
- Vespa G. N., Cunha F. Q. and Silva J. S. (1994) Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun* **62**, 5177-82.
- Viotti R., Vigliano C., Armenti H. and Segura E. (1994) Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J* **127**, 151-62.
- Wu G., Flynn N. E., Flynn S. P., Jolly C. A. and Davis P. K. (1999) Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats. *J Nutr* **129**, 1347-54.
- Wu G. and Morris S. M., Jr. (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* **336** (Pt 1), 1-17.
- Wu L. (2006) T lineage progenitors: the earliest steps en route to T lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **18**, 121-6.
- Yanez A., Murciano C., O'Connor J. E., Gozalbo D. and Gil M. L. (2009) *Candida albicans* triggers proliferation and differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells by a MyD88-dependent signaling. *Microbes Infect* **11**, 531-5.
- Yurchenko E., Shio M. T., Huang T. C., Da Silva Martins M., Szyf M., Levings M. K., Olivier M. and Piccirillo C. A. (2012) Inflammation-driven reprogramming of CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells into pathogenic Th1/Th17 T effectors is abrogated by mTOR inhibition in vivo. *PLoS One* **7**, e35572.
- Zhang P., Nelson S., Bagby G. J., Siggins R., 2nd, Shellito J. E. and Welsh D. A. (2008) The lineage-c-Kit+Sca-1⁺ cell response to *Escherichia coli* bacteremia in Balb/c mice. *Stem Cells* **26**, 1778-86.

REFERENCIAS

- Zhu X., Herrera G. and Ochoa J. B. (2010) Immunosuppression and infection after major surgery: a nutritional deficiency. *Crit Care Clin* **26**, 491-500, ix.
- Zingales B., Miles M. A., Campbell D. A., Tibayrenc M., Macedo A. M., Teixeira M. M., Schijman A. G., Llewellyn M. S., Lages-Silva E., Machado C. R., Andrade S. G. and Sturm N. R. (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* **12**, 240-53.
- Zoller A. L. and Kersh G. J. (2006) Estrogen induces thymic atrophy by eliminating early thymic progenitors and inhibiting proliferation of beta-selected thymocytes. *J Immunol* **176**, 7371-8.
- Zuniga E., Acosta-Rodriguez E., Merino M. C., Montes C. and Gruppi A. (2005) Depletion of immature B cells during *Trypanosoma cruzi* infection: involvement of myeloid cells and the cyclooxygenase pathway. *Eur J Immunol* **35**, 1849-58.

